



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**MAPEAMENTO DE BIOMARCADORES DO FLUÍDO
CREVICULAR PERI-IMPLANTAR COM UTILIDADE NO
DIAGNÓSTICO DE PERI-IMPLANTITE**

Trabalho submetido por
Daniela Inácio Marques
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Setembro de 2020



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**MAPEAMENTO DE BIOMARCADORES DO FLUÍDO
CREVICULAR PERI-IMPLANTAR COM UTILIDADE NO
DIAGNÓSTICO DE PERI-IMPLANTITE**

Trabalho submetido por
Daniela Inácio Marques
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Madalena Salema Oom

e coorientado por
Prof. Doutor Ricardo Alves

Setembro de 2020

À memória da minha Avó Isilda,

Que sempre desejou ver os netos formados.

AGRADECIMENTOS

Jamais seria possível a realização deste projeto final de curso sem o apoio incondicional de diversas pessoas. Quero assim deixar o meu profundo agradecimento:

À minha orientadora, Prof. Doutora Madalena Oom, por toda a disponibilidade, apoio e rigor transmitidos ao longo da realização deste trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Doutor Ricardo Alves, pela dedicação e disponibilidade demonstradas ao longo deste trabalho.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz por todas as vivências inesquecíveis e pessoas que me apresentou ao longo de cinco anos.

Um agradecimento especial à minha Mãe e ao meu Pai. Por tudo o que sacrificaram em prol do meu futuro. Por todo o apoio, incentivo e confiança depositada e por acreditarem mais em mim do que eu própria.

A toda a minha família, pelo apoio e motivação. Ao meu irmão Hugo, à Tia e ao Zé, por serem um exemplo e me motivarem sempre. Por serem para mim a personificação de altruísmo e cumplicidade.

À minha parceira de Box e amiga, Maria Ponte, um agradecimento especial. Por termos feito este percurso em conjunto. Por ser a minha fonte inesgotável de apoio e por todos os momentos que partilhámos ao longo de cinco anos.

A todos os amigos que fiz durante o meu percurso Académico, em especial à Joana M., Joana P., Inês e Tiago, por terem tornado esta experiência inesquecível desde o início, através de todos os momentos partilhados e lembranças criadas ao longo dos anos.

Às minhas amigas de longa data, Madalena B., Madalena P. e Mafalda, por serem as minhas amigas mais antigas. Por me acompanharem em mais uma etapa da minha vida e por toda a paciência e total disponibilidade.

RESUMO

Introdução: As doenças peri-implantares devem ser diagnosticadas precocemente de forma a permitir a intervenção antes que uma porção substancial do osso de suporte seja perdida. Os procedimentos de diagnóstico utilizados devem incluir parâmetros sensíveis para a detecção dos primeiros sinais e sintomas de infecção. Os métodos de diagnóstico mais comumente utilizados podem ser imprecisos, uma vez que avaliam apenas a destruição pré-existente, e não a atividade atual da doença. Ademais, não existe um modelo atual para prever a progressão da peri-implantite. A identificação de biomarcadores tanto no fluido crevicular do sulco peri-implantar saudável como naquele com bolsas peri-implantares, pode ser um complemento importante para o diagnóstico inicial e descrição do mecanismo das doenças peri-implantares.

Objetivos: Pretende-se com o presente trabalho fazer uma revisão do conhecimento atual sobre a composição do fluido crevicular e a comparação deste com o das bolsas, na presença de peri-implantite e descrição dos componentes identificados com papel promissor como marcadores de doença.

Métodos e Materiais: Foi realizada uma pesquisa bibliográfica, recorrendo a artigos científicos disponíveis nas bibliotecas eletrônicas Medline via pubmed e Google Scholar, utilizando as seguintes palavras-chave: *gingival crevicular fluid* e *periimplantitis biomarker*. Foram critérios de exclusão o ano de publicação anterior a 2000, o conteúdo não relevante para a revisão em questão e a impossibilidade de aceder ao artigo.

Resultados: Embora sejam necessários mais estudos, a avaliação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 β , TNF- α e MMP-8, no fluido crevicular peri-implantar pode ser útil no diagnóstico de peri-implantite e mucosite peri-implantar.

Discussão: Existem alguns biomarcadores promissores para o diagnóstico precoce e prognóstico das doenças peri-implantares, todavia, não há ainda um biomarcador específico capaz de identificar a futura perda de inserção ou a suscetibilidade à doença peri-implantar. As evidências atuais permanecem insuficientes para indicar se os biomarcadores predizem a progressão da doença peri-implantar.

Palavras-chave: Fluido Crevicular; Biomarcador de Peri-implantite.

ABSTRACT

Introduction: Peri-implant diseases must be diagnosed early in order to allow intervention before a substantial portion of the supporting bone is lost. The diagnostic procedures used should include sensitive parameters for detecting the first signs and symptoms of infection. The most commonly used diagnostic methods may be inaccurate, as they only assess the pre-existing destruction, not the current disease activity. Furthermore, there is no current model for predicting the progression of peri-implantitis. The identification of biomarkers in both the crevicular fluid of the healthy and pathologic peri-implant pockets can be an important complement to the initial diagnosis and description of the mechanism of peri-implant diseases.

Objectives: The aim of this review is to verify if the biomarkers present in the composition of crevicular fluid have clinical utility in the real time identification of active peri-implantitis, as well as in determining the degree of disease evolution.

Methods and Materials: A bibliographic search was performed using scientific articles available in the electronic libraries Medline via pubmed and Google Scholar, using the following keywords: *crevicular fluid, peri-implantitis biomarker*. Exclusion criteria were year of publication before 2000, the content with themes not relevant to the review in question and the impossibility of accessing the article.

Results: Although further studies are needed, the evaluation of pro-inflammatory cytokines, including IL-1 β , TNF- α and MMP-8, in the peri-implant crevicular fluid can be useful in the diagnosis of peri-implantitis and peri-implant mucositis.

Discussion: There are some promising biomarkers for the early diagnosis and prognosis of peri-implant diseases, however, there is still no specific biomarker capable of identifying future insertion loss or susceptibility to peri-implant disease. Current evidence remains insufficient to indicate whether biomarkers predict the progression of peri-implant disease.

Key-Words: Crevicular Fluid, Peri-Implantitis Biomarker.

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	13
II. DESENVOLVIMENTO.....	15
1. Doenças Peri-implantares	15
1.1. Definição e Patogénese das Doenças Peri-implantares	15
1.2. Etiologia e Epidemiologia das Doenças Peri-implantares.....	16
1.3. Diagnóstico das Doenças Peri-implantares	18
1.4. Tratamento das Doenças Peri-implantares	20
2. Biomarcadores do Fluido Crevicular Peri-implantar	21
2.1. O Fluido Crevicular	21
2.2. Biomarcadores do fluido crevicular	23
2.2.1. Enzimas derivadas do Hospedeiro.....	27
2.2.1.1. Aspartato Aminotransferase	27
2.2.1.2. Fosfatase Alcalina.....	28
2.2.1.3. Catepsina K.....	30
2.2.1.4. Metalopeptidases da Matriz.....	31
2.2.2. Mediadores inflamatórios e modificadores da resposta do hospedeiro	34
2.2.2.1. Citocinas	34
2.2.2.1.1. Citocinas Pró-Inflamatórias.....	34
2.2.2.1.2. Citocinas Anti-Inflamatórias	37
2.2.2.2. Prostaglandina E2	38
2.2.3. Produtos de degradação tecidual	39
2.2.3.1. RANK/RANKL/OPG	39
2.2.3.2. Osteocalcina/Osteopontina/Osteonectina	41
3. Métodos de recolha e análise do Fluido Crevicular Peri-implantar	44
3.1. Recolha através de lavagem gengival.....	45
3.2. Recolha através de tubos microcapilares ou micropipetas	45
3.3. Recolha através de tiras ou cones de papel absorvente	46
III. CONCLUSÃO.....	49
IV. BIBLIOGRAFIA	51

ÍNDICE DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 : Controlo da diferenciação de osteoclastos pelo sistema RANK/RANKL/OPG (Adaptado de Ney et al., 2012).....	40
Figura 2 : Representação das diversas abordagens para a recolha de fluído crevicular. a) Técnica Intrassulcular b) e c) Técnica Extrassulcular (Adaptado de Khurshid et al., 2017).	44
Figura 3: Recolha de fluído crevicular com recurso a micropipetas (Adaptado de Malhotra et al., 2010).	46
Figura 4: Recolha de fluído crevicular através de tiras ou cones de papel absorvente (Adaptado de Papagerkis et al., 2019).	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Composição do fluído crevicular (Adaptado de Khurshid et al., 2017).....	22
Tabela 2: Conteúdo de células do sistema imunológico no fluído crevicular (Adaptado de Rahnema et al., 2014).	23
Tabela 3 : Classificação dos biomarcadores do fluído crevicular (Adaptado de AlRowis et al., 2014).	25
Tabela 4 : Biomarcadores incluídos no estudo de Zani et al., (2016).	26
Tabela 5 : Classes de metalopeptidases da matriz (Adaptado de Laronha et al., 2020).	32

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP - Fosfatase alcalina

AST - Aspartato aminotransferase

ELISA - Ensaios de imunoabsorção enzimática

TNF - Fator de necrose tumoral

IL - Interleucina

HS - Hemorragia à Sondagem

MMP – Metalopeptidases da matriz

mRANKL - Ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa-B ancorado à membrana

OC - Osteocalcina

ON - Osteonectina

OPN - Osteopontina

OPG – Osteoprotegerina

PGE2 – Prostaglandina E2

PS - Profundidade de sondagem

RANK - Recetor ativador do fator nuclear kappa-B

RANKL - Ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa-B

sRANKL - Ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa-B solúvel

TNF - Fator de necrose tumoral

I. INTRODUÇÃO

A utilização clínica de reabilitações suportadas por implantes dentários osseointegrados, para restabelecer a capacidade de comer, falar e melhorar a componente estética do sorriso, tem vindo a aumentar significativamente nas últimas décadas. O tratamento com recurso a implantes dentários osseointegrados é um tratamento previsível e com uma elevada taxa de sucesso (Dursun & Tözüm, 2016). Todavia, há uma série de possíveis complicações biológicas que podem afetar os implantes osseointegrados, que são atualmente um tópico de grande interesse na área da medicina dentária. Podem ser distinguidas duas variedades clínicas das doenças peri-implantares, a mucosite peri-implantar e a peri-implantite. Enquanto a presença de uma lesão inflamatória é uma característica de ambas as condições, apenas a última forma apresenta perda de osso de suporte (Schwarz et al., 2018). Embora a taxa de sucesso dos implantes seja elevada, as falhas de implantes provocadas pelo estabelecimento das doenças peri-implantares constituem ainda um problema na prática clínica diária.

A combinação de parâmetros clínicos e radiográficos, como hemorragia à sondagem, profundidade de sondagem, mobilidade, supuração e perda óssea marginal, é atualmente o método mais comumente utilizado para o diagnóstico das doenças peri-implantares (Dursun & Tözüm, 2016). No entanto, este método de diagnóstico pode não ser sensíveis ou específicos o suficiente para diferenciar o início, o desenvolvimento ou a taxa de risco de desenvolver a doença, taxa de progressão e avaliação da resposta ao tratamento. Na tentativa de complementar os dados clínicos e radiográficos e aperfeiçoar o diagnóstico das doenças peri-implantares, têm sido propostos métodos de diagnóstico alternativos, priorizando aqueles com características não invasivas.

A avaliação dos níveis de diversos biomarcadores no fluido crevicular peri-implantar, fluido que se encontra em redor do implante, tem vindo a ser proposta como método auxiliar para a deteção precoce das doenças peri-implantares, principalmente pela facilidade de obtenção de amostras de forma não invasiva (Alassy et al., 2019). Uma vez que as doenças peri-implantares podem estar latentes nos seus estágios iniciais, a análise dos biomarcadores no fluido crevicular peri-implantar pode servir como uma ferramenta para o diagnóstico precoce da doença, determinação da suscetibilidade do paciente, prognóstico dos implantes afetados e para a escolha da abordagem de tratamento ideal para indivíduos-alvo (Zani et al., 2016).

II. DESENVOLVIMENTO

1. Doenças Peri-implantares

Os implantes dentários osseointegrados são considerados, desde a década de 1970, uma opção terapêutica previsível para a reabilitação de pacientes desdentados parciais ou totais, proporcionando uma função e estética satisfatórias a longo prazo (Brånemark et al., 1977). Estes tornaram-se uma opção terapêutica indispensável na medicina dentária, com utilidade em inúmeras situações clínicas.

Os principais fatores associados ao sucesso do tratamento com implantes osseointegrados são a estabilidade primária do implante, isto é, a estabilidade que o implante adquire na sua inserção no osso, e a inexistência de micromovimentos (Bhandari, 2019). Desta forma, define-se falha de um implante como mobilidade do implante no sentido vertical com dor e perda óssea progressiva que impliquem a remoção do mesmo (Misch et al., 2008), e pode ser classificada como falha precoce ou falha tardia. A falha precoce ocorre durante a fase de cicatrização relacionada com a ausência de osseointegração, isto é, de ligação funcional e estrutural entre o osso vital e a superfície de um implante em função (Brånemark et al., 1977). A falha tardia ocorre durante o período de *follow-up*, resultando de uma deficiente sustentação do processo de osseointegração, surgindo assim associada ao estabelecimento das doenças peri-implantares (Gupta et al., 2015).

1.1. Definição e Patogénese das Doenças Peri-implantares

A elevada taxa de sobrevivência dos implantes dentários osseointegrados está bem documentada na literatura. Contudo, é cada vez mais claro que mesmo os implantes com uma boa osseointegração são suscetíveis a processos inflamatórios que podem resultar na perda do implante (Bhandari, 2019). As lesões inflamatórias que se desenvolvem nos tecidos que rodeiam os implantes são denominadas doenças peri-implantares. De acordo com a classificação das doenças e condições periodontais e peri-implantares pela Academia Americana de Periodontologia e pela Federação Europeia de Periodontologia, a doença peri-implantar abrange três entidades: mucosite peri-implantar, peri-implantite e defeitos nos tecidos duros e tecidos moles peri-implantares (Caton et al., 2018). Em analogia à gengivite e periodontite, que afetam o periodonto dos dentes naturais, a

mucosite peri-implantar e peri-implantite afetam os tecidos moles e duros que rodeiam os implantes dentários.

A mucosite peri-implantar consiste num processo inflamatório reversível dos tecidos moles peri-implantares induzido pela presença de microrganismos (Mombelli et al., 2012). Clinicamente, caracteriza-se por vermelhidão, edema e hemorragia à sondagem. A mucosite peri-implantar precede a peri-implantite, apresentando potencial de evolução para perda progressiva de osso de suporte (Schwarz et al., 2018).

A peri-implantite, em contraste com a mucosite, é uma doença progressiva e irreversível dos tecidos que rodeiam o implante, com origem na adesão de microrganismos patogénicos formando biofilmes na superfície do implante e tecidos peri-implantares, sendo caracterizada por reabsorção óssea, diminuição da osseointegração, aumento da profundidade de sondagem, hemorragia e/ou supuração (Mombelli et al., 2012). A peri-implantite pode surgir precocemente após a colocação do implante e, na ausência de tratamento, parece progredir num padrão não linear de aceleração (Caton et al., 2018).

Por fim, os defeitos dos tecidos peri-implantares duros incluem defeitos intra-alveolares, deiscências, fenestrações, defeitos ósseos verticais e defeitos ósseos horizontais, enquanto que os defeitos dos tecidos peri-implantares moles incluem deficiências de volume e qualidade provenientes de diversas causas (Hämmerle & Tarnow, 2018).

O processo de destruição dos tecidos na peri-implantite compartilha características patológicas semelhantes à periodontite, principalmente no processo inflamatório em resposta à presença de biofilme bacteriano na superfície do implante ou dente (L. J. Heitz-Mayfield & Lang, 2010). Contudo, existem diferenças importantes relacionadas entre as duas condições, destacando-se na peri-implantite uma maior extensão do infiltrado inflamatório e disseminação do infiltrado inflamatório diretamente no osso (L. J. Heitz-Mayfield & Lang, 2010).

1.2. Etiologia e Epidemiologia das Doenças Peri-implantares

A transição de uma relação simbiótica com o hospedeiro para uma disbiose na mucosite peri-implantar e peri-implantite resulta numa resposta imune inflamatória aguda e libertação de produtos de degradação tecidual das bactérias, criando um ciclo patogénico auto-perpetuante (Rosier et al., 2018). As principais bactérias associadas às

doenças peri-implantares são as bactérias periodontopatogénicas anaeróbias gram-negativo, das quais se destacam *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Outros agentes patogénicos não considerados membros regulares da microbiota oral, incluindo *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e Enterobactérias, foram detetados numa frequência relativamente elevada em localizações com peri-implantite (Belibasakis & Manoil, 2020). Estes microrganismos têm tempos de duplicação curtos o que permite uma rápida adaptação evolutiva a ambientes hostis e desenvolvimento de estratégias eficazes de sobrevivência (Delima & Van Dyke, 2003).

Os mecanismos de defesa numa situação peri-implantar saudável são por norma suficientes para controlar a atividade microbiana, por meio de um epitélio juncional em normal função e migração de uma concentração elevada de células inflamatórias, células imunitárias e macromoléculas através desse epitélio. Em contrapartida, a destruição da integridade estrutural do epitélio juncional, que inclui a rutura dos contactos célula a célula e o descolamento da superfície do implante, levando à formação de um bolsa peri-implantar, desequilibra o funcionamento deste sistema de defesa. O aumento de profundidade da bolsa peri-implantar e a difusão apical do biofilme coloca em causa o normal funcionamento deste sistema. O adelgaçamento do epitélio e a sua ulceração aumentam a capacidade de invasão de microrganismos e dos seus produtos no tecido conjuntivo mole, agravando o processo inflamatório (Bosshardt, 2018). A presença de bactérias adjacentes ao sulco gengival e o contato íntimo entre lipopolissacarídeos bacterianos e as células hospedeiras leva a que monócitos, leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e outras células libertem os mediadores que levam à resposta inflamatória (Taba et al., 2005). Para além dos osteoclastos, osteoblastos e osteócitos, várias células do sistema imunológico, como neutrófilos polimorfonucleares, células B e células T, também foram implicadas no processo de remodelação óssea. Algumas citocinas como a interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α têm um papel conhecido na estimulação da perda óssea ao redor de dentes e implantes nos processos inflamatórios. Para além dessas citocinas, outros mediadores como a prostaglandina E2 (PGE2) e o ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL) também estão envolvidos na regulação da remodelação óssea (Xiao et al., 2015). Dependendo da gravidade da doença, pode desenvolver-se um ciclo vicioso no ambiente da bolsa peri-implantar difícil ou impossível de ser quebrado sem intervenção terapêutica.

Uma história prévia de periodontite, hábitos tabágicos e higiene oral inadequada, resultando em acumulação de placa bacteriana em torno dos implantes, são os principais

fatores de risco associados à peri-implantite (Saaby et al., 2016). Saaby et al. (2016) indicaram que a presença concomitante de uma história prévia de periodontite e hábitos tabágicos não aumenta a gravidade da peri-implantite, quando comparada com qualquer um destes dois fatores de risco isoladamente (Saaby et al., 2016). Para além destes fatores de risco, embora com evidência limitada, a diabetes com pouco controlo metabólico e o consumo de álcool parecem também estar associados a esta doença (Turri et al., 2016).

Revisões sistemáticas e metanálises dos últimos cinco anos indicam médias de prevalência para mucosite peri-implantar de 42,9% (Derks & Tomasi, 2015) e de 29,48% (Lee et al., 2017) dos implantes e 46,83% (Lee et al., 2017) dos pacientes. Para a peri-implantite, os valores médios relatados de prevalência ao nível do implante são 21,7% (Derks & Tomasi, 2015), 9,25% (Lee et al., 2017) e 12,8% (Rakic et al., 2018) e ao nível do paciente 19,83% (Lee et al., 2017) e 18,5% (Rakic et al., 2018). Esta discrepância de valores baseia-se maioritariamente em diferentes modelos de estudo e tamanhos de população, assim como em diferentes perfis de risco.

1.3. Diagnóstico das Doenças Peri-implantares

O diagnóstico das doenças peri-implantares baseia-se essencialmente em critérios clínicos, nos quais estão incluídos a profundidade de sondagem, hemorragia à sondagem, presença de supuração e mobilidade do implante. A sondagem dos implantes é uma ferramenta clínica essencial para a monitorização das condições dos tecidos peri-implantares e é incorporada como parte dos exames orais de rotina, semelhantes aos efetuados em dentes naturais. O aumento da profundidade de sondagem é indicativo da progressão da doença, podendo, no entanto, a medição ser influenciada pela extensão da inflamação, força de sondagem, localização do implante na cavidade oral, diferenças de forma e material da sonda utilizada e altura dos tecidos moles no local do implante (Dursun & Tözüm, 2016; Mombelli et al., 2012). A presença de hemorragia à sondagem e/ou de supuração sugere inflamação dos tecidos moles (Hirooka & Renvert, 2019). A avaliação da mobilidade dos implantes é também um parâmetro essencial no diagnóstico, sendo a sua presença um indicador de falta de osseointegração. Dado que a osseointegração é mantida apicalmente ao defeito e permanece algum contacto direto entre o osso e o implante, é possível ocorrer progressão da destruição óssea, sem mobilidade (Mombelli & Lang, 1998). Desta forma, a mobilidade do implante é um método insensível na deteção de estágios iniciais da doença peri-implantar mas vantajosa

para diagnosticar o estágio final da doença, podendo assim ajudar na decisão de remoção de um implante (Mombelli et al., 2012).

Em termos clínicos a saúde peri-implantar requer a ausência de sinais clínicos de inflamação, de hemorragia e supuração à sondagem suave e ausência de perda óssea para além da existente no decurso da remodelação óssea inicial. Ao contrário da periodontite, não é possível definir valores de profundidade de sondagem compatíveis com saúde e doença peri-implantar, avaliando-se apenas a variação dos valores de profundidade de sondagem, quando comparados com exames anteriores (Hirooka & Renvert, 2019).

A principal característica clínica da mucosite peri-implantar é a presença de hemorragia à sondagem suave. Contudo, podem ser também detetados outros sinais clínicos de inflamação, como eritema e edema. Embora o aumento da profundidade de sondagem seja uma característica da peri-implantite, é também frequentemente observado na mucosite peri-implantar, derivado do edema dos tecidos ou da diminuição da resistência à sondagem (L. J. A. Heitz-Mayfield & Salvi, 2018). Já a peri-implantite caracteriza-se clinicamente pela presença de hemorragia ou supuração numa sondagem suave, por um aumento progressivo da profundidade de sondagem e por uma perda óssea para além da expectável após o período de remodelação óssea inicial. Contudo, na ausência de exames anteriores, o diagnóstico de peri-implantite baseia-se em profundidades de sondagem ≥ 6 mm e níveis ósseos ≥ 3 mm para apical da plataforma do implante concomitantemente com sinais inflamatórios (Schwarz et al., 2018).

Para além da avaliação clínica é necessária a avaliação radiográfica das alterações dos níveis ósseos ao redor dos implantes para a distinção entre estados de saúde e doença. Radiograficamente, o defeito ósseo típico da peri-implantite é semelhante a uma cratera, envolve todo o implante e é estritamente demarcado (Mombelli et al., 2012).

A combinação de parâmetros radiográficos e clínicos, como os já referidos acima, é a estratégia mais comumente utilizada no diagnóstico das doenças peri-implantares. No entanto, este método de diagnóstico pode não ser específico ou sensível o suficiente para distinguir o início, o desenvolvimento e o grau de atividade da doença. Nenhum dos parâmetros clínicos habitualmente utilizados para avaliar o estado de saúde peri-implantar foi validado como ferramenta de diagnóstico fidedigna para monitorizar mudanças precoces nos tecidos peri-implantares. Contudo, a análise do fluido crevicular peri-implantar é indicada como um método auxiliar de diagnóstico essencial para a deteção de estágios iniciais destas patologias (Alassy et al., 2019).

1.4. Tratamento das Doenças Peri-implantares

A instrução de hábitos de higiene oral adequados, a avaliação regular de profundidades de sondagem nas diversas localizações do implante e o desbridamento mecânico dos implantes, são medidas de prevenção essenciais que devem ser instituídas subsequentemente à colocação de um implante (Smeets et al., 2014).

Em 2004 foi estabelecido um protocolo de medidas terapêuticas, designado de Terapia de Suporte Intercetiva Cumulativa (CIST), dependente do diagnóstico clínico e radiográfico, como resumido na tabela 1. Este protocolo é de natureza cumulativa, incluindo quatro estágios sequenciais de procedimentos terapêuticos: desbridamento mecânico (A), tratamento antisséptico (B), tratamento antibiótico (C) e cirurgia ressectiva ou regenerativa (D) (Lang et al., 2004).

Para o tratamento da mucosite peri-implantar, os métodos não cirúrgicos em associação à medicação antisséptica local são apropriados e suficientes. Estes incluem o desbridamento mecânico dos implantes com curetas de titânio ou plástico, ultrassons ou polimento a ar (Smeets et al., 2014).

O tratamento da peri-implantite pode ser efetuado com recurso a tratamentos conservadores, não cirúrgicos e/ou tratamentos cirúrgicos. Os métodos não cirúrgicos, tal como no tratamento da mucosite peri-implantar, baseiam-se no desbridamento mecânico dos implantes. Os tratamentos cirúrgicos podem ser efetuados através de abordagens ressectivas ou regenerativas (Smeets et al., 2014). O tratamento peri-implantar ressectivo visa a eliminação do biofilme e a manutenção das condições peri-implantares ideais, baseando-se particularmente na limpeza da superfície dos implantes (Smeets et al., 2014). O tratamento peri-implantar regenerativo, recorrendo a enxertos ósseos, membranas e fatores de crescimento, visa a criação de uma nova inserção, sendo esta a técnica de eleição quando se pretende uma redução considerável da profundidade de sondagem e um ganho ósseo (Mahato et al., 2016).

Não existe ainda consenso acerca do melhor protocolo para tratamento das doenças peri-implantares. Dadas as fisiopatologias idênticas, os protocolos para o tratamento da periodontite foram incorporados no tratamento da doença peri-implantar (Alassy et al., 2019). Contudo, a análise do nível de células inflamatórias, células imunes e macromoléculas no fluido crevicular peri-implantar é promissora para avaliação do estabelecimento e progressão da patologia peri-implantar.

2. Biomarcadores do Fluido Crevicular Peri-implantar

2.1. O Fluido Crevicular

O fluido crevicular é um fluido de composição variável, que se encontra no sulco gengival, entre o dente e a gengiva marginal. Em locais saudáveis, admite-se que a produção de fluido crevicular seja um transudato sérico devido à passagem de fluido dos capilares envoltivos para o sulco. Em locais inflamados ou estimulados mecanicamente, o fluido crevicular é considerado um exsudato inflamatório que atua como um mecanismo de proteção para a eliminação de bactérias e transporte de substâncias antibacterianas (Griffiths, 2003). Egelberg (1966) sugeriu que a produção de fluido crevicular era derivada de um aumento da permeabilidade dos vasos subjacentes ao epitélio juncional do sulco, podendo ocorrer devido a inflamação, trauma ou estimulação mecânica (Egelberg, 1966). Posteriormente, Alfano (1974) sugeriu que o mecanismo da formação do fluido crevicular inclui a formação de um gradiente osmótico e a indução de inflamação. São os subprodutos das bactérias do biofilme que se difundem através do epitélio crevicular até à membrana basal que geram este gradiente osmótico. A acumulação de macromoléculas na membrana basal leva a um aumento localizado da concentração de soluto e ao estabelecimento de um gradiente osmótico. Por sua vez, esse gradiente osmótico leva à passagem de água através da membrana basal, aumentando a pressão hidrostática intercelular e instigando a exsudação do fluido crevicular (Alfano, 1974). Já o modelo proposto por Pashley (1976) sugere que a produção de fluido crevicular advém de um aumento na taxa de transudação capilar, provocada pela liberação de mediadores inflamatórios. Este autor concluiu que os mediadores originam um aumento da pressão capilar e a libertação de proteínas plasmáticas no líquido intersticial e que a baixa complacência do tecido gengival resulta na movimentação do fluido intersticial do tecido conjuntivo para o sulco (Pashley, 1976).

A quantidade e composição do fluido crevicular varia de acordo com o estado de saúde dos tecidos periodontais, sendo menor a quantidade no sulco saudável e aumentando progressivamente com o processo de inflamação. Os principais fatores estimulantes do aumento do fluxo de fluido crevicular são a inflamação gengival, mastigação de alimentos duros, aplicação tópica de histaminas, enzimas e hormonas sexuais, ovulação, contraceptivos, tabagismo e após cirurgia periodontal (Subbarao et al., 2019). Um estudo de Goodson (2003) revelou a existência clara de um amplo espectro de

valores do fluxo de fluido crevicular relacionados com a doença. Em sulcos rasos, em indivíduos saudáveis, mediram-se taxas de fluxo de fluido crevicular de 3 a 8 ml/h, em indivíduos com doença periodontal moderada, de aproximadamente 20 ml/h e em indivíduos com doença periodontal avançada valores até 137 ml/h (Goodson, 2003).

O fluido crevicular é composto por elementos celulares, compostos orgânicos, compostos inorgânicos, enzimas e produtos bacterianos, como esquematizado na tabela 1 (Khurshid et al., 2017).

Tabela 1: Composição do fluido crevicular (Adaptado de Khurshid et al., 2017).

Elementos Celulares	Compostos Orgânicos	Compostos Inorgânicos	Enzimas endógenas	Produtos Bacterianos
Leucócitos	Proteínas 70 g/l	Sódio	Fosfatase ácida	Endotoxinas
polimorfonucleares	Albuminas 35 g/l	Potássio	Fosfatase alcalina	Enzimas do tipo tripsina
Linfócitos	Gama globulinas	Cálcio	Catepsinas	Fosfatase ácida
Monócitos	7,5 g/l	Magnésio	Elastase	Fosfatase alcalina
Células epiteliais	Imunoglobulinas	Fosfato	Colagenase	Substâncias semelhantes a prostaglandinas
			Beta-glucuronidase	
			Lactato desidrogenase	
			Lactoferrina	
			Lisozima	
			Activador de plasminogénio	
			Mieloperoxidases	
			Aspartato aminotransferase	
			Arilsulfatase	
			Gelatinases	

Os neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares) constituem entre 91 a 97% das células do sistema imunológico e prevalecem quantitativamente entre todos os leucócitos no fluido crevicular. Os restantes 2 e 3% são monócitos, macrófagos, linfócitos T, e linfócitos B, como esquematizado na tabela 2 (Rahnama et al., 2014).

Tabela 2: Conteúdo de células do sistema imunológico no fluido crevicular (Adaptado de Rahnama et al., 2014).

Tipo Celular	Fluído Crevicular
Neutrófilos	91-97%
Monócitos / Macrófagos	2-3%
Linfócitos	1-6%
Linfócitos T	29%
Linfócitos B	71%

Ao fluido crevicular presente no sulco peri-implantar dá-se o nome de fluido crevicular peri-implantar. O mecanismo de produção e o fluxo do fluido crevicular peri-implantar não diferem substancialmente dos observados nos sulcos e bolsas de dentes naturais, podendo, no entanto, ser observadas algumas discrepâncias volumétricas e na composição, dada a existência de dissimilaridades estruturais e vasculares entre a mucosa peri-implantar e a mucosa gengival (Attar et al., 2018).

2.2. Biomarcadores do fluido crevicular

O National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group definiu um biomarcador como sendo “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos normais biológicos, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica” (Atkinson et al., 2001). Assim, o biomarcador serve como indicador objetivo de um estado biológico observado de fora do paciente que pode ser medido com precisão e reprodutibilidade. Em termos práticos, o biomarcador consiste numa ferramenta que pode auxiliar na compreensão da causa, diagnóstico, progressão, regressão ou resultado do tratamento de uma doença (Papagerkis et al., 2019). Compreender a relação entre processos biológicos mensuráveis e os resultados clínicos é essencial para a especificidade dos tratamentos para todas as doenças, mas também para aprofundar a compreensão da fisiologia normal e saudável.

Existem três parâmetros principais para a validação de um biomarcador, sendo estes a validade analítica, validade clínica e utilidade clínica. A validade analítica consiste na capacidade do biomarcador medir o pressuposto e as medidas utilizadas são o limite de detecção, precisão, especificidade analítica, linearidade do teste, confiabilidade,

repetibilidade dos resultados e robustez do teste. A validade clínica surge associada à utilidade clínica e é expressa em termos da precisão do biomarcador, isto é, o grau em que é capaz de identificar pacientes com patologias alvo e é aferida através de estudos clínicos e epidemiológicos. A utilidade clínica baseia-se na utilidade do biomarcador para melhorar ou manter o nível de saúde do paciente, isto é, na capacidade de providenciar uma utilização mais eficiente dos recursos de assistência médica, sem comprometer o resultado do paciente (Bossuyt, 2010).

Os biomarcadores podem ser medidos em secreções como a saliva e o fluido crevicular. Os biomarcadores do fluido crevicular têm evidência moderada no diagnóstico de periodontite e os biomarcadores do fluido crevicular peri-implantar também apresentam resultados promissores em relação ao seu valor diagnóstico e prognóstico, vindo a demonstrar-se promissores na diferenciação da condição de doença e saúde peri-implantar. Consequentemente, os biomarcadores podem providenciar aos periodontologistas informações essenciais para melhorar os métodos de diagnóstico das doenças periodontais e peri-implantares e adequar os tratamentos, sendo a sua análise vantajosa pela facilidade de obtenção de amostras de forma não invasiva (Faot et al., 2015).

Uma vez que o fluido crevicular se acumula na margem gengival, contém não só biomarcadores derivados dos tecidos e soro do hospedeiro, mas também da placa bacteriana subgengival. Os biomarcadores conhecidos do fluido crevicular podem ser divididos em três categorias distintas: enzimas derivadas do hospedeiro, mediadores inflamatórios e modificadores da resposta do hospedeiro e produtos de degradação tecidular, como esquematizado na tabela 3 (AlRowis et al., 2014).

Tabela 3 : Classificação dos biomarcadores do fluido crevicular (Adaptado de AlRowis et al., 2014).

Enzimas derivadas do hospedeiro	Mediadores inflamatórios e modificadores da resposta do hospedeiro	Produtos de degradação tecidual
Aspartato aminotransferases	Prostaglandina E2	Glicosaminoglicanos
Fosfatase Alcalina	Ativador do plasminogénio	Hidroxiprolina
Fosfatase Ácida	tecidual	Fragmentos de fibronectina
β -Glucuronidase	Fator de ativação de plaquetas	Proteínas do tecido conjuntivo
Elastase e seus inibidores	Substância P	e osso:
Catepsinas	Inibidor do ativador de	- Osteonectina
Enzimas do tipo tripsina	plasminogénio-2	- Osteocalcina
Enzimas hidrolíticas de	Calgranulina A	- Osteopontina
imunoglobulinas	Neopterinina	- Peptídeos de colagénio
Dipeptidil peptidases	Peptídeo vasoativo intestinal	tipo I
Peptidases neutras não específicas	Neurocinina A	Laminina
MMPs e seus inibidores	CD14	Calprotectina
- Colagenases	Cistatinas	Peptídeos da cadeia β da
- Gelatinases	TNF- α , interferon- α	hemoglobina
Estromelisinases	Proteína quimioatraente de	Piridinolina
Mieloperoxidases	monócitos-1	Fatores de crescimento
Lactato desidrogenase	Anticorpos antibacterianos	
Arilsulfatase	RANTES	
β -N-acetil-hexosaminidase	Leucotrieno B4	
	Proteínas de fase aguda	
	Citocinas	

Embora a etiologia das doenças periodontais e peri-implantares seja a acumulação de microrganismos, o desenvolvimento e a progressão da doença são influenciados pela resposta do hospedeiro, que é modulada por fatores ambientais e comportamentais (Leppilahti et al., 2011). A progressão da doença envolve um conjunto de vias moleculares interatuantes com destaque para os mediadores pró-inflamatórios como citocinas, fatores de crescimento e metalopeptidases da matriz (MMPs), e os respectivos inibidores e reguladores (Dursun & Tözüm, 2016).

Foram avaliadas combinações de diversos biomarcadores do fluido crevicular com potencial para distinção do estado de doença e foi demonstrado um potencial significativo para o desenvolvimento de um modelo do status da doença periodontal nos fluidos orais. Num estudo em 145 implantes de 52 pacientes, Zani et al., (2016) procuraram examinar o potencial de modelos multi-biomarcadores serem usados para discriminar implantes com peri-implantite de implantes saudáveis. As classes de

biomarcadores incluídas no estudo foram citocinas pró-inflamatórias, citocinas anti-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e moduladores de células T (Tabela 4).

Tabela 4 : Biomarcadores incluídos no estudo de Zani et al., (2016).

Classes	Biomarcadores
Citocinas pró-inflamatórias	Interleucina-1 beta (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)
Citocinas anti-inflamatórias	Antagonista do recetor de interleucina-1 (IL-1ra), Interleucina-10 (IL-10) e Interleucina-13 (IL-13)
Quimiocinas	Macrófago derivado da quimiocina (MDC), eotaxina e proteína quimioatraente de monócitos-3 (MCP-3)
Fatores de crescimento	Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2), fator de crescimento derivado de plaquetas na isoforma BB (PDGF-BB), fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e ligante tirosina quinase 3 do tipo FMS (Flt-3L)
Moduladores de células T	Ligando CD40 humano solúvel (sCD-40L), Interleucina-17 (IL-17), Interleucina-12p40 (IL-12p40), Interleucina-12p70 (IL-12p70), Interleucina-2 (IL-2) e Interleucina-15 (IL-15).

Ao selecionar diferentes classes de biomarcadores, os investigadores procuraram melhorar as propriedades de diagnóstico dos modelos de multi-biomarcadores. Quase a totalidade das amostras apresentaram níveis detetáveis de todos os biomarcadores, sendo que dos vinte biomarcadores estudados, foram encontradas diferenças significativas entre localizações com saúde peri-implantar e localizações com peri-implantite, nos níveis de GM-CSF, MDC, IL-12p70, IL-13, PDGF- BB, IL-15, sCD40L, IL-17, IL-1, IL- 2, IL-6 e TNF- α , constituindo um total de doze biomarcadores. Os resultados obtidos revelam que mesmo os perfis de biomarcadores obtidos de localizações com saúde peri-implantar de implantes não controlados são capazes de discriminar saúde peri-implantar de peri-implantite, embora sejam necessários estudos longitudinais com amostras maiores para confirmar os resultados obtidos. Foi ainda evidente que a associação de seis biomarcadores (Flt-3L, GM-CSF, IL-10, sCD40L, IL-17 e TNF- α) elevou significativamente a qualidade de diagnóstico do modelo, quando comparado com o estudo de biomarcadores isolados, sugerindo que uma abordagem através de conjuntos de biomarcadores pode ser benéfica para o diagnóstico das doenças peri-implantares (Zani et al., 2016).

A maioria das investigações acerca da análise do nível de biomarcadores no fluído crevicular peri-implantar com utilidade no diagnóstico de peri-implantite focam-se no estudo da aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, catepsina K, metalopeptidases da matriz, citocinas anti-inflamatórias, citocinas pró-inflamatórias, prostaglandina E2, complexo RANK/RANKL/OPG, osteocalcina, osteopontina e osteonectina. Os biomarcadores referidos anteriormente serão abordados com maior detalhe na continuidade da revisão narrativa.

2.2.1. Enzimas derivadas do Hospedeiro

2.2.1.1. Aspartato Aminotransferase

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima citoplasmática normalmente confinada à célula, encontrando-se em maior concentração nas células epiteliais, fibroblastos e células polimorfonucleares (Paknejad et al., 2006). A sua libertação no meio extracelular tem vindo a ser associada ao metabolismo ósseo e a danos e morte celular, tornando-a um marcador inespecífico da morte celular, sendo comumente utilizada no diagnóstico de distúrbios que causam destruição de tecidos, como hepatite e enfarte do miocárdio (Paknejad et al., 2006). Uma vez que o metabolismo ósseo e a morte celular são componentes integrais e essenciais da destruição dos tecidos peri-implantares, os níveis desta enzima no fluído crevicular estão associados à atividade das doenças peri-implantares e correlacionados com parâmetros clínicos como profundidade de sondagem, hemorragia à sondagem e perda clínica de inserção (Oringer et al., 2001). A elevada atividade desta enzima surge associada à presença de agentes periodontopatogénicos, incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermedia* (Oringer et al., 2001).

Diversos estudos demonstram que a análise dos níveis de AST no fluído crevicular e fluído crevicular peri-implantar é útil para o diagnóstico de condições patológicas ao nível dos tecidos periodontais e peri-implantares, sendo que os níveis de AST aumentam significativamente em localizações com peri-implantite, quando comparadas com localizações peri-implantares saudáveis (Oringer et al., 2001; Paknejad et al., 2006). Contudo, Oringer et al. (2001) indicaram que o controlo do estabelecimento e progressão das doenças periodontais pode ser inviabilizado por resultados falso-positivos e falso-negativos, e que níveis elevados de AST são comumente detetados em tecidos sem sinais clínicos de progressão da doença (Oringer et al., 2001). Porém, Paolantonio et al.,

(2000) demonstraram que os níveis de AST são indicativos de diferentes condições peri-implantares, de acordo com critérios clínicos e radiográficos bem definidos. Neste estudo a atividade média de AST foi significativamente diferente entre implantes saudáveis $0,26 \pm 0,16$ U/ml e implantes com peri-implantite $0,62 \pm 0,29$ U/ml e também entre implantes com mucosite peri-implantar $0,38 \pm 0,27$ U/ml e com peri-implantite. Estes resultados parecem demonstrar, dentro das limitações do estudo transversal, que a mucosite peri-implantar e a peri-implantite diferem em relação à atividade de AST do fluido crevicular peri-implantar, podendo este fenómeno ser explicado pelo facto de os dois processos patológicos diferirem na quantidade de tecido envolvido e, portanto, na magnitude da destruição do tecido e consequente morte e danos celulares. O aparecimento de AST não está associado a danos no tecido causados pela sondagem, mas os implantes que sangraram durante a sondagem libertam maiores quantidades de AST, o que pode ser devido à facilidade com que os tecidos peri-implantes inflamados são penetrados pela ponta da sonda (Sánchez-Pérez et al., 2012). Neste estudo de Sánchez-Pérez et al., (2012) foi detetada uma relação significativa entre o nível de AST e o índice gengival em implantes com mucosite peri-implantar e $PS < 3$ mm (Sánchez-Pérez et al., 2012).

Existem atualmente disponíveis dois testes para avaliação do nível de AST no fluido crevicular, o Periogard e o Pocket Watch. O teste com o Periogard é um processo relativamente complexo que envolve várias etapas e que é projetado para ser positivo em valores de atividade de AST > 800 μ IU e negativo em valores < 800 μ IU. Contudo, o teste é incapaz de discriminar localizações com e sem perda de inserção (Mani et al., 2016). Por outro lado, o Pocket Watch é um teste de diagnóstico disponível em consultório que fornece não apenas um índice de morte celular, mas também a extensão de destruição das bolsas periodontais (Mani et al., 2016).

2.2.1.2. Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é uma glicoproteína que surge geralmente ancorada à superfície externa da membrana plasmática e que catalisa desfosforilação em ambiente alcalino, libertando fosfato inorgânico. É um membro da classe de enzimas conhecidas como fosfomonoesterases e é inespecífica, sendo capaz de atuar numa ampla variedade de substratos (Daltaban et al., 2006). A fosfatase alcalina está presente em leucócitos polimorfonucleares durante o processo de inflamação, osteoblastos no processo de formação óssea e fibroblastos do ligamento periodontal no processo de regeneração

periodontal. Pode também ser produzida pelas bactérias presentes no sulco ou bolsa periodontais. Desta forma, apresenta uma ação dupla, participando tanto no processo de inflamação periodontal como na regeneração dos tecidos. (Malhotra et al., 2010).

A ALP é considerada um marcador da atividade osteoblástica, uma vez que é essencial para o processo de deposição óssea, ao hidrolisar o pirofosfato inorgânico, um potente inibidor da formação e dissolução de cristais de hidroxiapatite, e é produzida em quantidades elevadas durante a fase de formação do ciclo ósseo (AlRowis et al., 2014; Daltaban et al., 2006). Fathima e Harish (2019) encontraram uma correlação positiva entre a atividade da ALP no fluido crevicular e os valores do índice de placa, índice gengival e o índice periodontal comunitário (Fathima & Harish, 2019).

Da mesma forma, diversos estudos detetam uma diferença estatisticamente significativa nos níveis de ALP entre localizações peri-implantares saudáveis e patológicas, com quantidades totais elevadas de ALP associadas a implantes com peri-implantite (Malik et al., 2015; Natarajan et al., 2017; Paknejad et al., 2006). Dado que a principal fonte de ALP no fluido crevicular são os leucócitos polimorfonucleares, o aumento da migração dos mesmos para o local da inflamação, pode ser atribuído ao aumento do nível desta enzima, assim como às bactérias gram-negativo, osteoblastos e fibroblastos (Malik et al., 2015). A maioria dos estudos detetam ainda níveis mais elevados de ALP no fluido crevicular peri-implantar em pacientes com valores mais elevados de índice de placa modificado, índice gengival modificado e hemorragia à sondagem, embora sem uma correlação significativa (Malik et al., 2015; Paknejad et al., 2006), com uma exceção. Num estudo que envolveu 42 pacientes, foi encontrada uma correlação significativa entre os níveis de ALP e o índice de placa (Natarajan et al., 2017). A terapêutica mecânica, associada a terapêutica farmacológica com clorexidina, mostrou uma redução considerável da quantidade total de ALP no fluido crevicular peri-implantar (Malik et al., 2015; Paolantonio et al., 2000). A associação de todos os fatores anteriormente descritos sugere que a análise da atividade da ALP no fluido crevicular peri-implantar pode contribuir para monitorizar as doenças peri-implantares, uma vez que as modificações enzimáticas ao nível do fluido crevicular antecedem as modificações clinicamente evidentes associadas à destruição do tecido (Malhotra et al., 2010).

2.2.1.3 Catepsina K

As catepsinas são uma classe de peptidases de cisteína responsáveis pelo processo de degradação de várias proteínas. Estas enzimas desempenham funções fulcrais em processos fisiológicos, como a angiogénese, isto é, processo de formação de novos vasos sanguíneos, cicatrização de feridas, apoptose, ativação enzimática, processamento hormonal, remodelação e reabsorção óssea. A libertação de catepsinas na sua forma inativa e a presença de iniciadores endógenos participam na manutenção do equilíbrio fisiológico. A desregulação destes dois componentes tem vindo a ser associada a diversas doenças sistémicas, incluindo aterosclerose, osteoporose, artrite, distúrbios neurológicos e cancro, mas também ao metabolismo ósseo (Benarji et al., 2019).

A catepsina K é uma endopeptidase de cisteína lisossómica, que a pH ácido desempenha um papel principal na reabsorção e remodelação óssea. É expressa predominantemente nos osteoclastos, mas é também encontrada em células mononucleares, macrófagos, células do músculo liso da aorta e células epiteliais da tiróide e pulmão (Yi et al., 2017). No processo de degradação do osso, os osteoclastos libertam ácido, que leva à dissolução da hidroxiapatite, e cria o ambiente adequado para a degradação de proteínas da matriz óssea, incluindo colagénio tipo I e osteonectina, pela catepsina K. A sobreexpressão da catepsina K pode provocar o aumento da taxa de reabsorção óssea, provocando uma diminuição da massa óssea. Através da sua ação, a catepsina K pode degradar ossos e cartilagens, tornando-a um possível biomarcador de interesse para a monitorização da atividade osteoclástica (Yi et al., 2017).

Strbac et al. (2006) determinaram, num estudo piloto, a concentração de catepsina K secretada para o fluido crevicular peri-implantar e descobriram que os níveis desta enzima eram significativamente maiores em pacientes com peri-implantite (22,4 pmol/amostra), quando comparados com pacientes com implantes saudáveis (10,1 pmol/amostra). Em adição, os níveis absolutos de catepsina K no fluido crevicular de todos os implantes analisados apresentaram correlação positiva com a profundidade de sondagem, índice de placa modificado e índice gengival modificado. Contudo, a análise dos dados obtidos revelou que se o nível de catepsina K fosse normalizado com a quantidade de fluido crevicular peri-implantar, mostraria uma correlação ligeiramente negativa com a gravidade da inflamação ao redor do implante. Esta correlação negativa pode estar associada à ligação de catepsina K ativa aos substratos sólidos da matriz extracelular. Ainda assim, quando normalizados à proteína eluída, os níveis de catepsina

K não aumentaram, indicando que a avaliação da catepsina K com uma combinação do método de amostragem intra-crevicular e do imunoensaio não responde aos requisitos de um marcador de detecção para a peri-implantite, uma vez que um biomarcador ideal requer um aumento proporcional ao volume de fluido crevicular (Strbac et al., 2006).

Posteriormente, Yamalik et al., (2012) demonstraram que a atividade de catepsina K está positivamente correlacionada com o volume de fluido crevicular peri-implantar em localizações com sinais clínicos de perda óssea, indicando desta forma, que pode ser um biomarcador usado para prever ou avaliar a perda óssea alveolar peri-implantar. Os níveis médios de atividade total de catepsina K dos subgrupos com saúde peri-implantar, mucosite peri-implantar e peri-implantite foram 3,637, 6,114 e 16,290 unidades, respectivamente, sendo que a diferença entre os três subgrupos em relação ao nível médio de atividade total de catepsina K foi significativa. Segundo os autores, a inflamação por si só não induz um aumento acentuado no nível total de atividade da catepsina K, contudo a perda óssea alveolar induz um aumento mais significativo. Os resultados do presente estudo realçam a importância da análise da catepsina K como uma ferramenta de diagnóstico, uma vez que as alterações enzimáticas a nível do fluido crevicular periodontal e peri-implantar, relacionadas com a perda óssea alveolar, precedem as alterações clínicas e radiográficas (Yamalik et al., 2012). Estes resultados são concordantes com os obtidos num estudo transversal de Rakic et al., (2014) onde foram detetados valores significativamente superiores de catepsina K em localizações com peri-implantite, quando comparados com localizações com saúde peri-implantar, mas não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis em localizações com peri-implantite e mucosite peri-implantar (Rakic et al., 2014).

Atualmente não é possível prever com precisão a quantidade de perda óssea que ocorre durante o processo destrutivo da peri-implantite. Assim, o desenvolvimento e implementação de uma ferramenta de diagnóstico simples e confiável com base na análise da catepsina K, na prática clínica, pode ser essencial para a detecção precoce de possíveis alterações nos tecidos peri-implantes.

2.2.1.4 Metalopeptidases da Matriz

As metalopeptidases da matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases dependentes de zinco e cálcio, secretadas por diversos tipos celulares incluindo neutrófilos, fibroblastos, monócitos, macrófagos, células endoteliais do epitélio sulcular

gingival e células plasmáticas (Sorsa et al., 2004). Estão envolvidas em processos fisiológicos, como o desenvolvimento, remodelação e cicatrização de tecidos, regulação da comunicação celular e em funções imunológicas, ao processarem citocinas, recetores de superfície celular, hormonas, moléculas de adesão celular, defensinas e fatores de crescimento, mas também em processos patológicos como o cancro, artrite e diabetes (Gupta et al., 2018). O papel das MMPs na patogénese das doenças peri-implantares, foca-se na sua capacidade de degradar quase a totalidade dos componentes da matriz extracelular e da membrana basal (Sorsa et al., 2004). A atividade das MMPs é regulada por um grupo de proteínas endógenas denominadas inibidores teciduais das metalopeptidases da matriz (TIMPs), capazes de inibir quase todos os membros da família MMP de forma não específica (Sorsa et al., 2006).

Tabela 5 : Classes de metalopeptidases da matriz (Adaptado de Laronha et al., 2020).

Classe	MMPs
Colagenases	MMP1, MMP8, MMP13
Gelatinases	MMP2, MMP9
Estromelisinases	MMP3, MMP10, MMP11
Matrilisinases	MMP7, MMP26
Metalopeptidases de membrana	MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24, MMP25
Outras metalopeptidases	MMP12, MMP19, MMP20, MMP21, MMP23, MMP27, MMP28

As MMPs são uma família de 23 enzimas estruturalmente relacionadas, mas geneticamente distintas, que podem ser subdivididas em seis grupos de acordo com o seu substrato preferencial: colagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinases, metalopeptidases de membrana e outras MMPs, como esquematizado na tabela 6 (Laronha et al., 2020). As colagenases e as gelatinases são as principais classes de MMPs associadas à destruição dos tecidos peri-implantares, com destaque na MMP1, MMP8, MMP9 e MMP13. A subclasse das colagenases tem um papel particularmente relevante pela sua capacidade de clivar a tripla hélice do colagénio fibrilar tipo I, II, III e IV, no domínio helicoidal assim como outras proteínas na matriz extracelular (Laronha et al., 2020; Sorsa et al., 2004).

A MMP8 é libertada dos neutrófilos por desgranulação seletiva estimulada por bactérias periodontopatogénicas e mediadores pró-inflamatórios derivados do hospedeiro, e é considerada a principal collagenase presente no fluido crevicular peri-implantar (Sorsa et al., 2006). Arakawa et al., (2012) demonstraram que os níveis de MMP8 são significativamente superiores aos níveis de MMP1 e MMP13 no fluido crevicular peri-implantar e constataram que a MMP8 é a principal collagenase presente nas localizações com peri-implantite (Arakawa et al., 2012). Para além de ser a mais abundante, os níveis de MMP8 aumentam significativamente em localizações com peri-implantite, quando comparados com localizações de implantes saudáveis (Arakawa et al., 2012; Ramseier et al., 2016; Song et al., 2019). Um estudo recente de Song et al., (2019) detetou níveis de MMP8 no fluido crevicular dos grupos com implantes saudáveis e implantes com peri-implantite de $0,12 \pm 0,03$ mg/l e $3,85 \pm 0,45$ mg/l, respetivamente (Song et al., 2019). A MMP8 tem uma associação positiva com os indicadores clínicos de peri-implantite, incluindo a hemorragia à sondagem, índice de placa, índice gengival e profundidade de sondagem (Ramseier et al., 2016; Song et al., 2019). Diversos estudos demonstram ainda que os níveis de MMP8 podem ser mantidos baixos em pacientes submetidos a terapia de suporte peri-implantar bem sucedida (Thierbach et al., 2016; Ziebolz et al., 2017). Desta forma, níveis elevados de MMP8 no fluido crevicular estão significativamente associados ao processo de inflamação peri-implantar e à perda óssea, sendo que níveis de MMP8 inferiores a 20 ng/ml são indicativos de um status peri-implantar saudável e/ou tratado com sucesso e níveis de MMP8 superiores a 20 ng/ml são indicativos de condições patológicas (Alassiri et al., 2018).

As fortes evidências da associação de níveis elevados de MMP8 no fluido crevicular, saliva e tecidos afetados em pacientes com patologias periodontais e peri-implantares, resultaram no desenvolvimento de um dispositivo imunológico *point-of-care* para quantificação dos níveis de MMP8 em fluídos orais. O dispositivo ImplantSafe apresenta grande interesse para a diferenciação entre localizações peri-implantares ativas e inativas de forma simples, económica e rápida, com elevada sensibilidade e especificidade (Alassiri et al., 2018). Os testes têm demonstrado ser úteis no rastreio de peri-implantite em pacientes e, mais concretamente, localizações suscetíveis, diferenciar localizações com peri-implantite ativa, prever a progressão futura da doença e monitorizar a resposta ao tratamento (Sorsa et al., 2017). Ao possuir a capacidade de detetar peri-implantite subclínica, ou seja, antes do aparecimento de sinais clínicos e radiográficos, pode ser essencial para a prevenção de danos irreversíveis nos implantes osseointegrados

(Sorsa et al., 2017). Todavia, são necessários futuros estudos prospectivos para garantir a validade deste teste desenvolvido para a periodontite na avaliação da peri-implantite.

2.2.2. Mediadores inflamatórios e modificadores da resposta do hospedeiro

2.2.2.1. Citocinas

As citocinas constituem um grupo de proteínas solúveis de baixo peso molecular, mediadores inespecíficos da reação inflamatória, responsáveis pelos sinais intercelulares necessários para a resposta celular a diferentes estímulos exógenos, tanto em condições fisiológicas como em condições patológicas. As citocinas classificam-se em quimiocinas, interferões, interleucinas (IL), fatores de crescimento tumoral (TNF), fatores de crescimento transformador (TGF) e fatores estimuladores de colônia (CSF) e são produzidas por macrófagos, linfócitos, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e células estromais (Kaur et al., 2017). Através da regulação do crescimento, mobilidade e diferenciação de leucócitos e outras células são capazes de modular o processo de inflamação e as reações imunes, podendo induzir ou suprimir a formação de osteoclastos (Kaur et al., 2017). Desta forma, as citocinas podem ser classificadas em pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, assumindo um papel importante na fisiopatologia de inúmeras doenças incluindo as doenças periodontais e peri-implantares (Alassy et al., 2019). O desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pode impedir a resolução do processo inflamatório e resultar na perpetuação da doença e destruição dos tecidos. As principais citocinas alvo de estudos, quanto ao seu potencial como biomarcadores de periodontite e peri-implantite, são a IL-1 β , IL-10 e TNF- α (Alassy et al., 2019). Porém, apesar de todas as deligências para quantificar as várias citocinas do fluido crevicular peri-implantar, a eficácia destes parâmetros para prever ou contribuir para o diagnóstico de peri-implantite ainda é inconclusiva.

2.2.2.1.1. Citocinas Pró-Inflamatórias

Uma citocina pró-inflamatória pode ser descrita como uma citocina que é produzida durante uma resposta inflamatória e que está associada ao início e/ou progressão da inflamação. As citocinas pró-inflamatórias promovem a atividade osteoclástica, podendo resultar na perda de dentes naturais ou de implantes dentários (Alassy et al., 2019). Assim, a quantificação de citocinas pró-inflamatórias pode ser uma

ferramenta fundamental para a detecção de lesões inflamatórias em estágio inicial, que podem ser ainda clinicamente latentes. A maioria das investigações, incluindo revisões sistemáticas e meta-análises, concentraram-se no estudo da Interleucina-1 β (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), pois são estas as principais citocinas envolvidas no processo de formação de osteoclastos e, conseqüentemente, no processo de remodelação e reabsorção óssea. O aumento significativo do nível destas três citocinas no fluido crevicular peri-implantar surge associado a localizações com peri-implantite, quando comparadas com localizações em implantes saudáveis (Alassy et al., 2019). Algumas evidências sugerem que a IL-1 β atua sinergicamente com o TNF- α para iniciar e propagar a inflamação. A IL-1 β compartilha com o TNF- α , a capacidade de regular positivamente o RANKL, bem como outros fatores indutores de osteoclastos, e existem evidências em modelos animais de que a IL-1 β é essencial para o efeito osteoclastogénico do TNF- α (Schett, 2011).

A IL-1 β pertence à família IL-1 juntamente com vários outros membros. Esta família foi uma das primeiras a ser descrita e é profusamente estudada. A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória produzida primariamente por células da linhagem monocítica, incluindo monócitos, células dendríticas e macrófagos, que inicia e amplifica uma vasta diversidade de efeitos associados à imunidade inata e respostas do hospedeiro à invasão microbiana e lesão tecidual (Eder, 2009). Além do seu papel benéfico na mediação das respostas do hospedeiro à invasão microbiana, a IL-1 β também pode ter efeitos prejudiciais, ao facilitar a invasão tumoral e promover dano tecidual na patogénese de doenças inflamatórias crónicas. A IL-1 β tem como funções regular a degradação dos componentes da matriz extracelular do sistema plasminogénico e a atividade das collagenases (Casado et al., 2013).

A generalidade das evidências atuais relata níveis aumentados de IL-1 β no fluido crevicular peri-implantar de implantes com peri implantite, quando comparados com implantes saudáveis, sendo ainda detetada uma diminuição da degradação e progressão da inflamação dos tecidos periodontais e peri-implantares, quando se inibe a IL-1 β (Delima & Van Dyke, 2003; Fonseca et al., 2014; Ketabi et al., 2017; Teixeira et al., 2017). A partir de um modelo experimental de gengivite, demonstrou-se que os níveis de IL-1 β no fluido crevicular aumentam rapidamente com a acumulação de placa bacteriana e com a conseqüente progressão da inflamação gengival (Kinane et al., 1992). Posteriormente, um estudo em fluido crevicular peri-implantar, também revelou um aumento significativo do nível de IL-1 β após três semanas de suspensão das medidas de

higiene oral, revertendo para níveis pré-experimentais sessenta e nove dias após o restabelecimento das mesmas medidas (Schierano et al., 2008), corroborando o potencial desta citocina como marcador precoce de alterações na inflamação gengival.

Os níveis de IL-1 β são também mais elevados no caso de implantes com peri-implantite, incluindo localizações com perda óssea peri-implantar (Fonseca et al., 2014; Teixeira et al., 2017), contudo, não foram detetadas diferenças significativas entre os níveis de IL-1 β na mucosite peri-implantar e peri-implantite, sugerindo que, uma vez estabelecido e iniciado o processo inflamatório, não existe disparidade entre estágios iniciais e avançados das doenças peri-implantares (Faot et al., 2015).

O TNF- α é uma citocina pleiotrópica, isto é, capaz de atuar em diversos tipos celulares, produzida principalmente por macrófagos e monócitos. Esta citocina está envolvida no processo de defesa, inflamação e apoptose do hospedeiro e desempenha uma dupla ação na regulação das respostas imunes, atuando tanto como mediador pró-inflamatório, ao iniciar uma resposta inflamatória, como como mediador imunossupressor, ao inibir o desenvolvimento de doenças autoimunes e limitar a extensão e a duração dos processos inflamatórios (Faot et al., 2015). O papel fundamental do TNF- α na inflamação foca-se na ativação da expressão de outras citocinas e quimiocinas, indução da expressão da molécula de adesão celular endotelial, promoção da angiogénese, supressão da atividade reguladora das células T e sensibilização à dor. O TNF- α exerce o seu efeito sobre a osteoclastogénese, atuando diretamente nos precursores dos osteoclastos, bem como indiretamente, ao regular positivamente a produção de M-CSF e RANKL em células mesenquimais, reduzindo a capacidade de reparação dos tecidos peri-implantares (Schett, 2011). Níveis mais elevados de TNF- α no fluido crevicular peri-implantar surgem associados a localizações de implantes com patologia peri-implantar, quando comparados com implantes saudáveis (Fonseca et al., 2014; Ketabi et al., 2017; Teixeira et al., 2017). Contudo, tal como a IL-1 β , o nível de TNF- α no fluido crevicular peri-implantar não apresenta uma correlação com a severidade da inflamação. Como revisto por Faot et al., (2015), não foram detetadas diferenças estatísticas entre a mucosite peri-implantar e a peri-implantite, quando os níveis de IL-1 β e TNF- α foram comparados no fluido crevicular peri-implantar (Faot et al., 2015).

Outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-6 e IL-8, também são biomarcadores comprovados para inflamação periodontal e reabsorção óssea alveolar e, portanto, são potenciais biomarcadores para a peri-implantite (Kaur et al., 2017). Destas,

a IL-6 está envolvida na diferenciação das células T CD4 e, tal como a IL-1 β e TNF- α , é um regulador positivo da osteoclastogénese (Ghassib et al., 2019). Existe atualmente uma ampla evidência da presença de níveis mais elevados de IL-6 nos tecidos periodontais inflamados que nos tecidos sãos (Ghassib et al., 2019). A IL-8, por outro lado, é uma quimiocina produzida por células epiteliais e endoteliais e macrófagos e tem um papel importante no recrutamento e desgranulação de neutrófilos durante a inflamação, sendo assim fundamental para a resposta inflamatória precoce. No entanto, não foi detetada uma diferença nos níveis de IL-8 entre grupos com saúde peri-implantar e peri-implantite (Severino et al., 2011).

Existe evidência limitada na literatura de que estas citocinas pró-inflamatórias estão presentes em maior concentração no fluido crevicular em implantes com peri-implantite em comparação com implantes saudáveis (Wohlfahrt et al., 2014; Zani et al., 2016). No entanto, ao contrário do relatado acerca da IL-1 β e TNF- α , a concentração de IL-6 no fluido crevicular peri-implantar aumenta significativamente entre localizações com mucosite peri-implantar e peri-implantite, sugerindo que esta pode desempenhar um papel essencial no padrão não linear de perda óssea na peri-implantite (Schwarz et al., 2018).

2.2.2.1.2. Citocinas Anti-Inflamatórias

As citocinas anti-inflamatórias são um conjunto de moléculas imunorreguladoras que controlam a resposta pró-inflamatória das citocinas, inibindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias, particularmente da IL-1 β e TNF- α . As principais citocinas anti-inflamatórias são o antagonista do recetor de interleucina-1, IL-4, IL-10, IL-11 e IL-13. Já o interferon-alfa, IL-6 e o fator de TGF- β podem ser classificados tanto como citocinas anti-inflamatórias como pró-inflamatórias (Schett, 2011).

A IL-10 é a principal citocina anti-inflamatória estudada quanto ao seu potencial no diagnóstico das doenças peri-implantares. É uma citocina anti-inflamatória potente que suprime respostas inflamatórias e imunoproliferativas (Zhang et al., 2014). A IL-10 pode regular negativamente a síntese de IL-1, IL-6 e TNF- α , e a síntese de óxido nítrico, gelatinase e colagenase. Para além disso, a IL-10 inibe a formação de RANKL e aumenta a produção de osteoprotegerina (OPG), mediadores envolvidos no processo de remodelação óssea, reduzindo desta forma a reabsorção óssea associada à atividade

osteoclástica, podendo ser considerada um importante regulador da homeostasia óssea (Zhang et al., 2014).

Na literatura estão relatados níveis mais reduzidos de IL-10 em pacientes com periodontite crônica, quando comparados com grupos controle saudáveis, sendo sugerido que o estabelecimento e progressão da inflamação periodontal pode derivar da falta ou resposta inadequada das citocinas anti-inflamatórias (Dursun & Tözüm, 2016). Da mesma forma, alguns estudos verificaram que os níveis de IL-10 no fluido crevicular peri-implantar estão correlacionados negativamente com a doença peri-implantar (Casado et al., 2013; Zani et al., 2016) no entanto, esta correlação significativa nem sempre é observada (Severino et al., 2011, 2016).

Outras citocinas anti-inflamatórias, incluindo a IL-4, IL-8 e IL-12 não mostraram diferenças significativas no seu nível no fluido crevicular peri-implantar entre estados de saúde peri-implantar e a doença peri-implantar (Alassy et al., 2019).

2.2.2.2. Prostaglandina E2

A Prostaglandina E2 (PGE2) é uma molécula multifuncional cuja produção é regulada pela enzima cicloxigenase (COX). Os macrófagos são uma das principais fontes de PGE2 nos tecidos periodontais e estimulam os osteoblastos a libertarem fatores que levam ao estímulo de osteoclastos e consequente reabsorção óssea (Xiao et al., 2015). A PGE2 tem sido associada à estimulação da expressão do gene do fator de crescimento semelhante à insulina 1, que promove a síntese de colagénio pelos osteoblastos, promovendo assim a formação óssea (Minamizaki et al., 2009). Esta molécula possui diversos efeitos pró-inflamatórios, tanto nos tecidos periodontais, como nos tecidos peri-implantares, sendo a sua ação baseada na vasodilatação, isto é, aumento da permeabilidade vascular nas localizações com inflamação, ativação de osteoclastos e mediação da reabsorção óssea (Basegmez et al., 2012).

Uma investigação longitudinal de Basegmez et al., (2012) procurou detetar os níveis de PGE2 no fluido crevicular peri-implantar até 18 meses após osseointegração e avaliar a correlação com parâmetros clínicos, de forma determinar a utilidade deste biomarcador no diagnóstico precoce da peri-implantite. Foram detetados níveis de PGE2 significativamente mais baixos nos primeiros doze meses, $30,21 \pm 2,23$ ng/bolsa ao 3º mês, $29,58 \pm 2,79$ ng/bolsa ao 6º mês e $31,03 \pm 2,56$ ng/bolsa ao 12º mês, quando comparados com os níveis do 18º mês, onde se mediram $51,67 \pm 3,96$ ng/bolsa, sendo este

aumento significativo. Num estudo anterior realizado pelos mesmo autores, tinham sido registados níveis superiores de PGE2 no fluido crevicular em localizações com mucosite peri-implantar, quando comparados com localizações de implantes saudáveis, tendo ainda sido encontrada uma associação entre este aumento, com o aumento da profundidade de sondagem (Yalçın et al., 2005). Os resultados obtidos em ambos os estudos sustentam a hipótese da existência de uma associação entre níveis elevados de PGE2 em localizações com inflamação gengival e formação de bolsas.

2.2.3. Produtos de degradação tecidular

2.2.3.1. RANK/RANKL/OPG

A descoberta do complexo RANK/RANKL/OPG tem sido essencial para auxiliar na compreensão do processo de remodelação óssea e, consequentemente, das causas das patologias ósseas como a perda resultante da peri-implantite. Neste caso há uma predominância da reabsorção óssea e redução da massa óssea em torno do implante. Na reabsorção, os osteoclastos tornam-se ativados quando ligados ao RANKL, indiretamente na sua forma solúvel (sRANKL), ou diretamente ao RANKL na forma de proteínas ancoradas à membrana (mRANKL) nos pré-osteoblastos (Sharaf-Eldin et al., 2016). As células do revestimento ósseo expõem a superfície da matriz óssea aos osteoclastos que selam uma zona onde secretam ácido e enzimas hidrolíticas, que, por sua vez, reabsorvem o osso danificado (Kapasa et al., 2017). Desta forma, a interação entre estes três membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF): o recetor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK), o ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG) é responsável pela estimulação e inibição da osteoclastogénese e, consequentemente, pela promoção e inibição da reabsorção óssea.

O RANK é um recetor expresso por diferentes tecidos, como o músculo esquelético, fígado, cólon, próstata, pâncreas, timo e glândulas mamárias e por células da série monócitos-macrófagos, como os precursores de osteoclastos, osteoclastos maduros, células B e T, células dendríticas, fibroblastos e condrócitos. A sinalização do RANK resulta no comprometimento das células precursoras de monócitos/macrófagos com a linhagem de osteoclastos e ativação de osteoclastos maduros (Ney et al., 2012).

O RANKL é uma proteína que pode ser expressa na forma de proteínas ancoradas à membrana (mRANKL) ou numa forma solúvel (sRANKL) em osteoblastos, células estromais, fibroblastos e células B e T, quando estimulados por citocinas ou

lipopolissacarídeos bacterianos. É produzido em diversos tecidos como osso, pulmão, tecidos linfoides e medula óssea e liga-se ao RANK encontrado na superfície dos precursores de osteoclastos, estimulando a reabsorção óssea através da osteoclastogênese (Sharaf-Eldin et al., 2016).

Por outro lado, a OPG é uma proteína solúvel produzida na medula óssea, fígado, pulmão, rim, timo e linfonodos e expressa por osteoblastos, osteócitos e fibroblastos. Ao apresentar uma sequência homóloga ao RANK, compete para a ligação ao RANKL, impedindo este último de se ligar ao receptor, bloqueando assim o efeito indutor de osteoclastogênese (Kapasa et al., 2017).

Como representado na fig. 1, quando o nível de RANKL em torno dos pré-osteoclastos é superior em relação ao nível de OPG, o RANKL está livre para se ligar ao RANK expresso nos precursores osteoclásticos, promovendo a sobrevivência e ativação osteoclástica, com consequente aumento da reabsorção óssea. Em alternativa, quando a concentração de OPG é superior à de RANKL, a OPG liga-se ao RANKL, impedindo desta forma a sua ligação ao RANK, resultando numa redução da velocidade e intensidade da osteoclastogênese e promoção da apoptose de osteoclastos diferenciados e ativados, com consequente inibição da reabsorção óssea (Sharaf-Eldin et al., 2016).

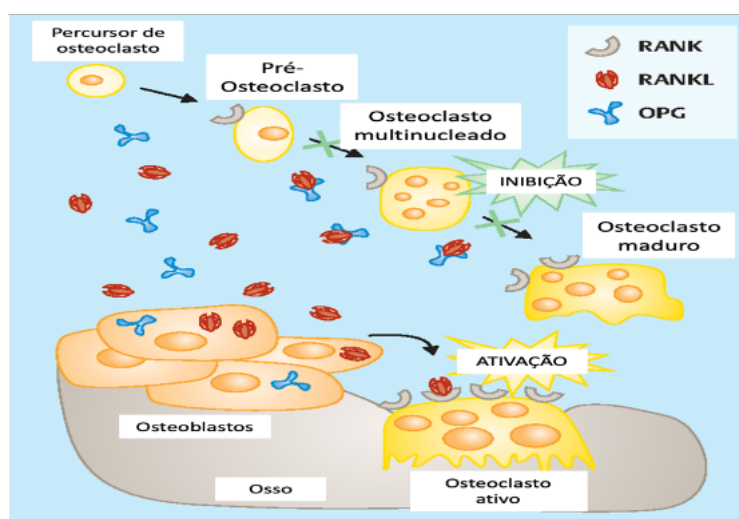


Figura 1 : Controlo da diferenciação de osteoclastos pelo sistema RANK/RANKL/OPG (Adaptado de Ney et al., 2012).

Até hoje, existe um número limitado de estudos acerca do papel do complexo RANK/RANKL/OPG na doença peri-implantar. A maioria dos estudos não identifica

diferenças significativas nos níveis destes biomarcadores do metabolismo ósseo entre localizações saudáveis e com peri-implantite (Dursun & Tözüm, 2016). Os níveis de RANKL e OPG solúveis foram avaliados em 84 amostras de fluido crevicular peri-implantar de implantes com diferentes condições clínicas, sem demonstrar qualquer correlação entre esses níveis e os resultados clínicos estudados (Monov et al., 2006). Contudo, estudos mais recentes envolvendo diversos indivíduos com saúde peri-implantar, peri-implantite e periodontite, estabeleceram correlações significativas entre as concentrações de RANKL, RANK e OPG e a profundidade de sondagem, hemorragia à sondagem e nível clínico de inserção (Rakic et al., 2013; Yakar et al., 2019). Existe uma associação positiva entre níveis mais elevados de OPG com o status peri-implantar saudável e entre níveis mais elevados de RANKL com o status de doença peri-implantar (Alassy et al., 2019). Embora diversos estudos relatem níveis significativamente mais altos de RANKL, OPG e RANK em localizações com peri-implantite em comparação com localizações com saúde peri-implantar, existem algumas discrepâncias relatadas entre os estudos para a razão RANKL/OPG como um indicador de gravidade ou atividade da doença peri-implantar. Alguns estudos detetam diferenças na relação RANKL/OPG, embora não estatisticamente significativas (Rakic et al., 2013; Yakar et al., 2019).

Rakic et al., (2013) relataram uma maior relação RANKL/OPG na peri-implantite, quando comparada com a periodontite, propondo que este fenômeno pode ser devido à progressão da lesão inflamatória diretamente no osso que rodeia os implantes osseointegrados (Rakic et al., 2013). Em seguimento, Yakar et al., (2019) detetaram uma relação RANKL/OPG significativamente maior no grupo com saúde peri-implantar, em relação ao grupo com saúde periodontal, podendo estes resultados estar relacionados com uma maior taxa de progressão de uma lesão subclínica nos implantes (Yakar et al., 2019).

2.2.3.2. Osteocalcina/Osteopontina/Osteonectina

Diversos estudos recentes acerca dos mecanismos de mineralização do tecido conjuntivo e remodelação óssea destacam o potencial papel de três proteínas não colagenosas da matriz, a osteocalcina (OC), osteopontina (OPN) e a osteonectina (ON) (Alassy et al., 2019).

A OC é uma proteína pertencente à família das proteínas dependentes da vitamina K, produzida e secretada quase exclusivamente por osteoblastos. Menores quantidades são também produzidas por odontoblastos e condrócitos hipertróficos (Ram et al., 2015).

As funções detalhadas e o mecanismo de ação da OC não são ainda bem compreendidos, no entanto, pensa-se que desempenha um papel vital no desenvolvimento esquelético, sendo considerado um marcador da formação e remodelação óssea. A OC secretada pelos osteoblastos possui uma elevada afinidade à hidroxiapatite óssea. Esta propriedade foi proposta como o mecanismo que permite que a OC inicie a formação de cristais de hidroxiapatite e, por conseguinte, promova a mineralização óssea. Durante o processo de reabsorção óssea pelos osteoclastos, o pH ácido do meio faz com que os grupos carboxilo da OC sejam removidos e que a OC descarboxilada seja libertada e entre na circulação sanguínea. Os níveis circulantes de OC descarboxilada são desta forma dependentes da taxa de remodelação óssea (Zoch et al., 2016).

A OPN é uma proteína com elevada capacidade de ligação ao cálcio, produzida por diversas células, incluindo osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e macrófagos (Singh et al., 2018). Embora seja considerada um componente principal da matriz extracelular do cimento e do osso alveolar, é encontrada em diversos tecidos não mineralizados, incluindo o rim, células do músculo liso arterial e superfície luminal das células epiteliais dos tecidos ductais (Ram et al., 2015). A OPN está envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo remodelação óssea, biomineralização, cicatrização de feridas e apoptose (Ram et al., 2015). Considera-se que desempenha um papel fundamental, tanto na formação como na reabsorção óssea, através da regulação da adesão, fixação e disseminação de osteoclastos à superfície óssea. Perturbações num destes mecanismos podem induzir um efeito tipo cascata que leva a consequências noutros mediadores ósseos (Singh et al., 2018).

A ON é uma proteína de ligação ao cálcio e um componente da matriz óssea com um papel na interação célula-matriz na remodelação dos tecidos e é secretada tanto por osteoblastos como por células endoteliais e fibroblastos (Ram et al., 2015). Os mecanismos através dos quais a osteonectina influencia a formação, manutenção e reparação óssea ocorrem através de várias vias, incluindo a regulação do processamento de pro-colagénio e ligação na matriz óssea, mineralização óssea e diferenciação e atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Pensava-se que a ON era expressa especificamente nos tecidos mineralizados contudo, foi posteriormente demonstrado que tem um padrão de expressão amplo, tanto nos tecidos mineralizados como nos não mineralizados (Cakal et al., 2018). A sua expressão está intimamente relacionada com a ligação entre o colagénio e a hidroxiapatite e com a libertação de iões de cálcio, promovendo desta forma a mineralização da matriz de colagénio no osso. A evidência de

que a osteonectina contribui para a mineralização óssea é apoiada por níveis aumentados da sua concentração no fluido crevicular, correlacionados com níveis mais baixos de perda óssea em pacientes com doença periodontal (Ram et al., 2015).

São ainda limitados os estudos que avaliam os níveis de OC, OPN e ON em diferentes condições peri-implantares. Tümer et al., (2008) examinaram os níveis de OC no fluido crevicular peri-implantar pela técnica de radioimunoensaio e detetaram níveis mais elevados em localizações com peri-implantite quando comparados com localizações peri-implantares saudáveis (Tümer et al., 2008). Já Murata et al., (2002) detetaram níveis de OC significativamente mais elevados em localizações com mucosite peri-implantar quando comparados com localizações saudáveis, embora não tenham encontrado diferenças significativas entre localizações com peri-implantite e localizações com mucosite peri-implantar ou saúde peri-implantar (Murata et al., 2002). Cakal et al., (2017), num estudo mais recente, não encontraram diferenças significativas nas quantidades totais de OC no fluido crevicular peri-implantar entre controlos saudáveis, grupos com mucosite peri-implantar e grupos com peri-implantite, concluindo que a inflamação dos tecidos moles ao redor de implantes dentários osseointegrados e o estabelecimento de peri-implantite não causam uma alteração nos níveis de OC no fluido crevicular peri-implantar. Estes resultados contraditórios podem originar de diferentes protocolos de estudo, podendo sugerir-se que a doença peri-implantar não estava em estágio de progressão no momento de amostragem (Cakal et al., 2018). Para além disso, um outro estudo demonstrou que não existe uma redução significativa nos níveis de OC no fluido crevicular peri-implantar após o tratamento cirúrgico da peri-implantite (Wohlfahrt et al., 2014).

Foi demonstrado que os níveis de OPN são mais elevados no fluido crevicular em localizações com periodontite, quando comparados com localizações saudáveis e que o tratamento periodontal incita a diminuição dos níveis deste biomarcador (Sharma & Pradeep, 2007). Contudo, embora seja espectável uma alteração nos níveis deste biomarcador no fluido crevicular peri-implantar, devido ao seu papel no processo de formação óssea, não é detetada uma diferença significativa entre localizações com peri-implantite, mucosite peri-implantar e localizações saudáveis (Cakal et al., 2018).

Existe um número muito limitado de estudos acerca da ON nas doenças periodontais e doenças peri-implantares. Cakal et al., (2018) esperavam uma mudança nos níveis de ON no fluido crevicular peri-implantar, principalmente em implantes com peri-implantite, devido ao seu papel na formação óssea, mas os resultados do estudo não

demonstraram diferença entre o grupo controlo e implantes com peri-implantite (Cakal et al., 2018).

3. Métodos de recolha e análise do Fluido Crevicular Peri-implantar

Existem diversas técnicas para a recolha de fluido crevicular peri-implantar. A técnica eleita deve depender dos objetivos do estudo, uma vez que cada técnica apresenta vantagens e desvantagens. Os principais problemas associados à recolha de fluido crevicular são a contaminação com sangue, saliva ou placa bacteriana, um tempo prolongado de recolha e a perda de água por evaporação, resultando num erro na determinação de volume (Wassall & Preshaw, 2016). A contaminação da amostra pode resultar não só numa determinação incorreta do volume, como também da composição do fluido crevicular, enquanto que a recolha demorada de fluido crevicular pode resultar numa concentração elevada de biomarcadores, quando comparada com outras amostras recolhidas num menor período de tempo (Wassall & Preshaw, 2016).

Os métodos de recolha podem ser, de maneira geral, divididos em técnicas intra ou extrassulculares (fig. 2) e em três estratégias básicas, sendo estas: métodos de lavagem gengival, por meio de túbulos microcapilares ou micropipetas e utilização de tiras ou cones de papel de filtro absorvente (Khurshid et al., 2017).

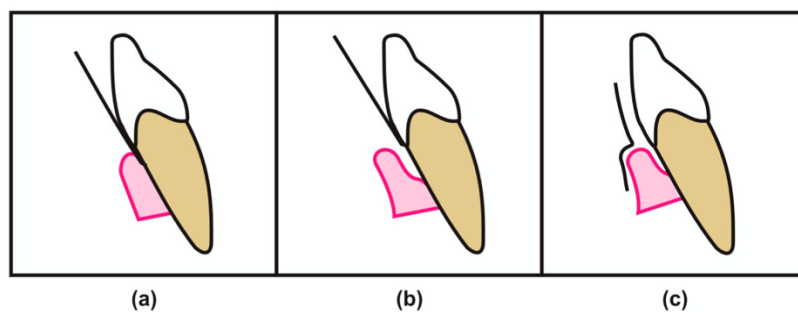


Figura 2 : Representação das diversas abordagens para a recolha de fluido crevicular. a) Técnica Intrassulcular b) e c) Técnica Extrassulcular (Adaptado de Khurshid et al., 2017).

O método mais comumente utilizado para a recolha de fluido crevicular peri-implantar é o método com recurso a cones e tiras de papel, inseridas no sulco ou bolsa gengival normalmente por 30 segundos (Alassy et al., 2019). Por representar um método rápido, simples e não traumático, este método tem vindo a ser o mais recomendado. Destes materiais, as tiras de papel destacam-se por apresentarem uma maior taxa de recuperação de biomarcadores (Attar et al., 2018).

Após a recolha do fluído crevicular peri-implantar, a amostra é eluída para uma solução tampão ou diluente, e o fluído crevicular peri-implantar é avaliado utilizando ensaios específicos para os biomarcadores. O teste ELISA, citometria de fluxo, luminex e espectrofotometria são os ensaios mais utilizados na análise do fluído crevicular, dependendo do marcador alvo. Segundo uma revisão sistemática, a maioria dos estudos utilizam o teste ELISA para analisar um ou dois biomarcadores do fluído crevicular peri-implantar (Alassy et al., 2019).

3.1. Recolha através de lavagem gengival

A lavagem gengival consiste na irrigação do sulco gengival com uma solução isotónica, resultando a amostra recolhida numa diluição de fluído crevicular. O instrumento utilizado é caracterizado por duas agulhas de injeção encaixadas uma dentro da outra, de forma que durante a amostragem a agulha de ejeção mais fina esteja na parte inferior do sulco ou bolsa e a agulha de recolha, na margem gengival. A solução de irrigação é ejetada manualmente e drenada imediatamente através da agulha de recolha, para um tubo de amostra, através de um ato de sucção contínua. Esta técnica é particularmente vantajosa para a recolha de células da região do sulco gengival (Nazar Majeed et al., 2016).

A principal desvantagem desta técnica é a incapacidade de recuperação de todo o fluído crevicular peri-implantar, durante o procedimento de aspiração. Desta forma, é impossível obter a quantificação exata do volume e composição do fluído crevicular peri-implantar, dada a incapacidade de determinar o fator de diluição de forma precisa (Griffiths, 2003).

3.2. Recolha através de tubos microcapilares ou micropipetas

Após o isolamento e secagem de uma determinada localização, são inseridos na entrada do sulco gengival tubos capilares de diâmetro conhecido (fig.3). O fluído crevicular peri-implantar migra para dentro do tubo por ação capilar e, uma vez que o diâmetro deste é conhecido, o volume de fluído pode ser determinado com precisão, medindo a distância da sua migração. Esta técnica aparenta ser ideal, uma vez que fornece uma amostra não diluída de fluído crevicular peri-implantar. No entanto, é difícil a

obtenção de uma amostra com volume adequado para análise, num curto período de tempo e a remoção completa da amostra dos tubos (Nazar Majeed et al., 2016).



Figura 3: Recolha de fluído crevicular com recurso a micropipetas (Adaptado de Malhotra et al., 2010).

3.3. Recolha através de tiras ou cones de papel absorvente

A recolha do fluído crevicular peri-implantar por meio de tiras de papel ou cones de papel absorvente é um método não invasivo e profusamente utilizado (fig. 4). Existem variações consideráveis na aplicação do método de recolha de fluído crevicular com tiras de papel absorvente, referindo-se não apenas ao método e ao momento da recolha das amostras, mas também aos meios de calcular o volume da amostra recolhida (Nazar Majeed et al., 2016).



Figura 4: Recolha de fluído crevicular através de tiras de papel absorvente (Adaptado de Papagerkis et al., 2019).

Uma vez que o papel apresenta uma tendência a dobrar sob a pressão de inserção, à medida que se torna cada vez mais saturado com fluído, o posicionamento das tiras de papel absorvente à profundidade de sondagem de uma bolsa periodontal são muitas vezes malsucedidas. Desta forma, a inserção das tiras de papel é geralmente efetuada no

máximo a 1–2 mm de profundidade do sulco ou bolsa peri-implantar e são deixadas *in situ* por 5 a 60 segundos (Wassall & Preshaw, 2016).

Quando comparada a outros métodos disponíveis, a quantificação do volume de fluído crevicular através de meios eletrónicos oferece algumas vantagens evidentes. O Periotron é um aparelho capaz de quantificar o volume de fluído crevicular e saliva recolhido em tiras de papel absorvente. O aparelho mede a capacitância elétrica de uma tira de papel húmida colocada na sua superfície. O campo elétrico criado por cargas opostas induz a polaridade das moléculas, o que reduz a diferença de potencial entre as placas e aumenta a capacitância. Desta forma, quanto maior o número de moléculas polares entre as placas do Periotron, maior a capacitância e consequentemente, maior a pontuação do Periotron. O volume de fluído desconhecido em tiras de papel de filtro pode ser determinado a partir de gráficos de calibração construídos através de quantidades de fluído medidas com precisão (Sehdev et al., 2017).

III. CONCLUSÃO

Com o consequente aumento do número de implantes osseointegrados colocados, surge também o aumento do número de lesões peri-implantares. Deste modo, é essencial que o primeiro passo a ser dado passe por um diagnóstico meticuloso que possa promover a execução de um plano de tratamento adequado, contribuindo assim para um resultado satisfatório.

Os parâmetros clínicos utilizados atualmente para o diagnóstico das doenças peri-implantares, como a determinação do nível clínico de inserção, profundidade de sondagem e hemorragia à sondagem, não são suficientemente sensíveis e específicos para a detecção de estádios iniciais de peri-implantite, levando à pesquisa de ferramentas adicionais como os marcadores moleculares

A análise de biomarcadores do fluido crevicular peri-implantar é uma ferramenta promissora para o diagnóstico precoce de alterações nos tecidos peri-implantares. Os biomarcadores são medidas objetivas e quantificáveis da atividade da doença, que permitem indicar, avaliar e monitorizar a doença peri-implantar de forma mais específica.

O interesse na investigação do fluido crevicular peri-implantar advém da facilidade de obtenção de amostras de forma minimamente invasiva e do seu valor preditivo, permitindo a identificação do risco de alterações futuras nas localizações avaliadas.

De acordo com a literatura publicada, existem alguns biomarcadores promissores para o diagnóstico precoce e prognóstico das doenças peri-implantares, no entanto, não há ainda um biomarcador que possa identificar a futura perda de inserção ou a suscetibilidade à doença peri-implantar. Embora sejam necessários mais estudos, a avaliação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 β , TNF- α e MMP-8, no fluido crevicular peri-implantar pode ser útil no diagnóstico de peri-implantite e mucosite peri-implantar. Os testes de diagnóstico disponíveis em consultório para a análise de biomarcadores, como a MMP-8, na detecção de doenças peri-implantares, são promissores, contudo ainda pouco utilizados na prática clínica comum.

Seria de interesse investigações futuras focarem-se na abordagem de múltiplos biomarcadores ao invés de um biomarcador único, uma vez que modelos de multi-biomarcadores já demonstraram possuir uma maior validade diagnóstica.

IV. BIBLIOGRAFIA

- Alassiri, S., Parnanen, P., Rathnayake, N., Johannsen, G., Heikkinen, A. M., Lazzara, R., Van Der Schoor, P., Van Der Schoor, J. G., Tervahartiala, T., Gieselmann, D., & Sorsa, T. (2018). The Ability of Quantitative, Specific, and Sensitive Point-of-Care/Chair-Side Oral Fluid Immunotests for aMMP-8 to Detect Periodontal and Peri-Implant Diseases. *Disease Markers*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1306396>
- Alassy, H., Parachuru, P., & Wolff, L. (2019). Peri-implantitis diagnosis and prognosis using biomarkers in peri-implant crevicular fluid: A narrative review. *Diagnostics*, 9(4), 214. <https://doi.org/10.3390/diagnostics9040214>
- Alfano, M. C. (1974). The origin of gingival fluid. *Journal of Theoretical Biology*, 47(1), 127–136. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(74\)90103-9](https://doi.org/10.1016/0022-5193(74)90103-9)
- AlRowis, R., AlMoharib, H. S., AlMubarak, A., Bhaskardoss, J., Preethanath, R. S., & Anil, S. (2014). Oral fluid-based biomarkers in periodontal disease - part 2. Gingival crevicular fluid. *Journal of International Oral Health : JIOH*, 6(5), 126–135.
- Arakawa, H., Uehara, J., Hara, E. S., Sonoyama, W., Kimura, A., Kanyama, M., Matsuka, Y., & Kuboki, T. (2012). Matrix metalloproteinase-8 is the major potential collagenase in active peri-implantitis. *Journal of Prosthodontic Research*, 56(4), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2012.07.002>
- Atkinson, A. J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., Hoth, D. F., Oates, J. A., Peck, C. C., Schooley, R. T., Spilker, B. A., Woodcock, J., & Zeger, S. L. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), 89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
- Attar, N. B., Banodkar, A. B., Gaikwad, R. P., Sethna, G. D., Patil, C. L., & Simon, S. (2018). Evaluation of gingival crevicular fluid volume in relation to clinical periodontal status with periotron 8000. *International Journal of Applied Dental Sciences*, 4(1), 68–71. <http://www.oraljournal.com/archives/2018/4/1/B/4-1-3>
- Basegmez, C., Yalcin, S., Yalcin, F., Ersanli, S., & Mijiritsky, E. (2012). Evaluation of periimplant crevicular fluid prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-8 levels from health to periimplant disease status: A prospective study. *Implant Dentistry*, 21(4), 306–310. <https://doi.org/10.1097/ID.0b013e3182588408>
- Belibasakis, G. N., & Manoil, D. (2020). Microbial Community-Driven Etiopathogenesis

- of Peri-Implantitis. *Journal of Dental Research*.
<https://doi.org/10.1177/0022034520949851>
- Benarji, K. A., Lakshmi, K. R., Nelakurthi, H., Haritha, P., & Amrutha, R. (2019). Cathepsins in oral diseases. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, 8(3), 153. https://doi.org/10.4103/jdrntruhs.jdrntruhs_54_19
- Bhandari, M. A. (2019). Effect of Surface Design and Morphology on Primary Stability of Dental Implant: A Systematic Review. *EC Dental Science*, 18, 401–409.
- Bosshardt, D. D. (2018). The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. *Periodontology* 2000, 76(1), 43–50.
<https://doi.org/10.1111/prd.12153>
- Bossuyt, P. M. (2010). Clinical validity: Defining biomarker performance. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 70(sup242), 46–52.
<https://doi.org/10.3109/00365513.2010.493383>
- Brånemark, P. I., Hansson, B. O., Adell, R., Breine, U., Lindström, J., Hallén, O., & Ohman, A. (1977). Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery. Supplementum*, 16, 1–132.
- Cakal, O. T., Efeoglu, C., & Bozkurt, E. (2018). The evaluation of peri-implant sulcus fluid osteocalcin, osteopontin, and osteonectin levels in peri-implant diseases. *Journal of Periodontology*, 89(4), 418–423.
- Casado, P. L., Canullo, L., de Almeida Filardy, A., Granjeiro, J. M., Barboza, E. P., & Leite Duarte, M. E. (2013). Interleukins 1 β and 10 expressions in the periimplant crevicular fluid from patients with untreated periimplant disease. *Implant Dentistry*, 22(2), 143–150. <https://doi.org/10.1097/ID.0b013e3182818792>
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*, 45 Suppl 2, S1–S8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>
- Daltaban, Ö., Saygun, I., Bal, B., Balos, K., & Serdar, M. (2006). Gingival Crevicular Fluid Alkaline Phosphatase Levels in Postmenopausal Women: Effects of Phase I Periodontal Treatment. *Journal of Periodontology*, 77(1), 67–72.
<https://doi.org/10.1902/jop.2006.77.1.67>
- Delima, A. J., & Van Dyke, T. E. (2003). Origin and function of the cellular components

- in gingival crevice fluid. *Periodontology* 2000, 31, 155–176. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2003.03105.x>
- Derks, J., & Tomasi, C. (2015). Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *Journal of Clinical Periodontology*, 42 Suppl 1, S158–S171. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12334>
- Dursun, E., & Tözüm, T. F. (2016). Peri-Implant Crevicular Fluid Analysis, Enzymes and Biomarkers: a Systemetic Review. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, 7(3), e9. <https://doi.org/10.5037/jomr.2016.7309>
- Egelberg, J. (1966). Permeability of the dento-gingival blood vessels: I. Application of the vascular labelling method and gingival fluid measurements. *Journal of Periodontal Research*, 1(3), 180–191. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1966.tb01858.x>
- Faot, F., Nascimento, G. G., Bielemann, A. M., Campão, T. D., Leite, F. R., & Quirynen, M. (2015). Can Peri-Implant Crevicular Fluid Assist in the Diagnosis of Peri-Implantitis? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Periodontology*, 86(5), 631–645. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.140603>
- Fathima, K. H., & Harish, V. S. (2019). Evaluation of Alkaline Phosphatase in Gingival Crevicular Fluid among Chronic Periodontitis Patients with Smoking Habit. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research*, 7(7), 163–167. <https://doi.org/10.21276/jamdsr>
- Fonseca, F. J., Moraes Junior, M., Lourenço, E. J., Teles, D., & Figueredo, C. M. (2014). Cytokines expression in saliva and peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implant disease. *Clinical Oral Implants Research*, 25(2), e68–e72. <https://doi.org/10.1111/clr.12052>
- Ghassib, I., Chen, Z., Zhu, J., & Wang, H. L. (2019). Use of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and MMP-8 biomarkers to distinguish peri-implant diseases: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 21(1), 190–207. <https://doi.org/10.1111/cid.12694>
- Goodson, J. M. (2003). Gingival crevice fluid flow. *Periodontology* 2000, 31, 43–54. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2003.03104.x>
- Griffiths, G. S. (2003). Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology* 2000, 31, 32–42. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2003.03103.x>
- Gupta, S., Chhina, S., & Arora, S. A. (2018). A systematic review of biomarkers of gingival crevicular fluid: Their predictive role in diagnosis of periodontal disease

- status. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 8(2), 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2018.02.002>
- Gupta, S., Gupta, H., & Tandan, A. (2015). Technical complications of implant-causes and management: A comprehensive review. *National Journal of Maxillofacial Surgery*, 6(1), 3–8. <https://doi.org/10.4103/0975-5950.168233>
- Hämmerle, C. H. F., & Tarnow, D. (2018). The etiology of hard- and soft-tissue deficiencies at dental implants: A narrative review. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S267–S277. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12955>
- Heitz-Mayfield, L. J. A., & Salvi, G. E. (2018). Peri-implant mucositis. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S237-245. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12953>
- Heitz-Mayfield, L. J., & Lang, N. P. (2010). Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontology 2000*, 53, 167–181. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00348.x>
- Hirooka, H., & Renvert, S. (2019). Diagnosis of Periimplant Disease. *Implant Dentistry*, 28(2), 144–149. <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000868>
- Kapasa, E. R., Giannoudis, P. V, Jia, X., Hatton, P. V, & Yang, X. B. (2017). The Effect of RANKL/OPG Balance on Reducing Implant Complications. *Journal of Functional Biomaterials*, 8(4), 42. <https://doi.org/10.3390/jfb8040042>
- Kaur, A., Kharbanda, O. P., Kapoor, P., & Kalyanasundaram, D. (2017). A review of biomarkers in peri-miniscrew implant crevicular fluid (PMICF). *Progress in Orthodontics*, 18(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s40510-017-0195-8>
- Ketabi, A. R., Friese, H., & Weber, H. (2017). A Comparison Of Il-1 β , E2 (Pge2), Pai-2 and Tnf-A Levels in Gingival Crevicular Fluid (Gcf) and Peri-Implant Crevicular Fluid (Picf) from Groups of Patients with Healthy Teeth, Healthy Implants, Periodontitis and Peri-Implantitis. *Dentistry*, 7(445), 1122–2161. <https://doi.org/10.4172/2161-1122.1000445>
- Khurshid, Z., Mali, M., Naseem, M., Najeeb, S., & Zafar, M. S. (2017). Human Gingival Crevicular Fluids (GCF) Proteomics: An Overview. *Dentistry Journal*, 5(1), 12. <https://doi.org/10.3390/dj5010012>
- Kinane, D. F., Winstanley, F. P., Adonogianaki, E., & Moughal, N. A. (1992). Bioassay of interleukin 1 (IL-1) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Archives of Oral Biology*, 37(2), 153–156. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(92\)90011-V](https://doi.org/10.1016/0003-9969(92)90011-V)
- Lang, N. P., Berglundh, T., Heitz-Mayfield, L. J. a, Pjetursson, B. E., Salvi, G. E., &

- Sanz, M. (2004). Group 2 Consensus Statement Consensus Statements and Recommended Clinical Procedures Regarding Esthetics in Implant Dentistry. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 19 suppl, 73–74.
- Laronha, H., Carpinteiro, I., Portugal, J., Azul, A., Polido, M., Petrova, K. T., Salema-Oom, M., & Caldeira, J. (2020). Challenges in matrix metalloproteinases inhibition. *Biomolecules*, 10(5), 717. <https://doi.org/10.3390/biom10050717>
- Lee, C. T., Huang, Y. W., Zhu, L., & Weltman, R. (2017). Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*, 62, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.04.011>
- Leppilahti, J. M., Ahonen, M. M., Hernández, M., Munjal, S., Netuschil, L., Uitto, V. J., Sorsa, T., & Mäntylä, P. (2011). Oral rinse MMP-8 point-of-care immuno test identifies patients with strong periodontal inflammatory burden. *Oral Diseases*, 17(1), 115–122. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01716.x>
- Mahato, N., Wu, X., & Wang, L. (2016). Management of peri-implantitis: a systematic review, 2010–2015. *SpringerPlus*, 5, 105. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1735-2>
- Malhotra, R., Grover, V., Kapoor, A., & Kapur, R. (2010). Alkaline phosphatase as a periodontal disease marker. *Indian Journal of Dental Research*, 21(4), 531–536. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.74209>
- Malik, N., Naik, D., & Uppoor, A. (2015). Levels of Myeloperoxidase and Alkaline Phosphatase in Periimplant Sulcus Fluid in Health and Disease and after Nonsurgical Therapy. *Implant Dentistry*, 24(4), 434–440. <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000277>
- Mani, A., Anarthe, R., Marawar, P., Mustilwar, R., & Bhosale, A. (2016). Diagnostic kits: An aid to periodontal diagnosis. *Journal of Dental Research and Review*, 3(3), 107. <https://doi.org/10.4103/2348-2915.194837>
- Minamizaki, T., Yoshiko, Y., Kozai, K., Aubin, J. E., & Maeda, N. (2009). EP2 and EP4 receptors differentially mediate MAPK pathways underlying anabolic actions of prostaglandin E2 on bone formation in rat calvaria cell cultures. *Bone*, 44(6), 1177–1185. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.02.010>
- Misch, C. E., Perel, M. L., Wang, H. L., Sammartino, G., Galindo-Moreno, P., Trisi, P., Steigmann, M., Rebaudi, A., Palti, A., Pikos, M. A., Schwartz-Arad, D., Choukroun, J., Gutierrez-Perez, J. L., Marenzi, G., & Valavanis, D. K. (2008). Implant success, survival, and failure: The International Congress of Oral Implantologists (ICOI) pisa

- consensus conference. *Implant Dentistry*, 17(1), 5–15.
<https://doi.org/10.1097/ID.0b013e3181676059>
- Mombelli, A., & Lang, N. P. (1998). The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontology* 2000, 17, 63–76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1998.tb00124.x>
- Mombelli, A., Müller, N., & Cionca, N. (2012). The epidemiology of peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*, 23, 67–76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02541.x>
- Monov, G., Strbac, G. D., Baron, M., Kandler, B., Watzek, G., & Gruber, R. (2006). Soluble RANKL in crevicular fluid of dental implants: A pilot study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 8(3), 135–141.
<https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2006.00012.x>
- Murata, M., Tatsumi, J., Kato, Y., Suda, S., Nunokawa, Y., Kobayashi, Y., Takeda, H., Araki, H., Shin, K., Okuda, K., Miyata, T., & Yoshie, H. (2002). Osteocalcin, deoxypyridinoline and interleukin-1 β in peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*, 13(6), 637–643.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2002.130610.x>
- Natarajan, P. M., Chandran, C. R., & Prabhu, P. (2017). Comparison of enzyme beta glucuronidase and alkaline phosphatase levels in peri implant sulcular fluid around healthy and diseased implants - A clinical pilot study. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 10(2), 855–860. <https://doi.org/10.13005/bpj/1177>
- Nazar Majeed, Z., Philip, K., Alabsi, A. M., Pushparajan, S., & Swaminathan, D. (2016). Identification of Gingival Crevicular Fluid Sampling, Analytical Methods, and Oral Biomarkers for the Diagnosis and Monitoring of Periodontal Diseases: A Systematic Review. *Disease Markers*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1804727>
- Ney, J., Fehm, T., Juhasz-Boess, I., & Solomayer, E. (2012). RANK, RANKL and OPG Expression in Breast Cancer – Influence on Osseous Metastasis. *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde*, 72(5), 385–391. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1298276>
- Oringer, R. J., Howell, T. H., Nevins, M. L., Reasner, D. S., Davis, G. H., Sekler, J., & Fiorellini, J. P. (2001). Relationship Between Crevicular Aspartate Aminotransferase Levels and Periodontal Disease Progression. *Journal of Periodontology*, 72(1), 17–24. <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.1.17>
- Paknejad, M., Emtiaz, S., Khoobyari, M. M., Gharb, M. T., & Yazdi, M. T. (2006). Analysis of aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase in crevicular fluid

- from implants with and without peri-implantitis. *Implant Dentistry*, 15(1), 62–69.
<https://doi.org/10.1097/01.id.0000202416.23259.35>
- Paolantonio, M., Di Placido, G., Tumini, V., Stilio, M. Di, Contento, A., & Spoto, G. (2000). Aspartate Aminotransferase Activity in Crevicular Fluid From Dental Implants. *Journal of Periodontology*, 71(7), 1151–1157.
<https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.7.1151>
- Papagerkis, P., Zheng, L., Kim, D., Said, R., Ehlert, A. A., Chung, K., & Papagerakis, S. (2019). Saliva and Gingival Crevicular Fluid (GCF) Collection for Biomarker Screening. *Methods in Molecular Biology*, 1922, 549–562.
https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9012-2_41
- Pashley, D. H. (1976). A mechanistic analysis of gingival fluid production. *Journal of Periodontal Research*, 11(2), 121–134. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1976.tb00060.x>
- Rahnama, M., Czupkałło, Ł., Kozicka-Czupkałło, M., & Łobacz, M. (2014). Gingival Crevicular Fluid – Composition and Clinical Importance in Gingivitis and Periodontitis. *Polish Journal of Public Health*, 124(2), 96–98.
<https://doi.org/10.2478/pjph-2014-0022>
- Rakic, M., Galindo-Moreno, P., Monje, A., Radovanovic, S., Wang, H. L., Cochran, D., Sculean, A., & Canullo, L. (2018). How frequent does peri-implantitis occur? A systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*, 22(4), 1805–1816. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2276-y>
- Rakic, M., Lekovic, V., Nikolic-Jakoba, N., Vojvodic, D., Petkovic-Curcin, A., & Sanz, M. (2013). Bone loss biomarkers associated with peri-implantitis. A cross-sectional study. *Clinical Oral Implants Research*, 24(10), 1110–1116.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02518.x>
- Rakic, M., Struillou, X., Petkovic-Curcin, A., Matic, S., Canullo, L., Sanz, M., & Vojvodic, D. (2014). Estimation of Bone Loss Biomarkers as a Diagnostic Tool for Peri-Implantitis. *Journal of Periodontology*, 85(11), 1566–1574.
<https://doi.org/10.1902/jop.2014.140069>
- Ram, V. S., Parthiban, Sudhakar, U., Mithradas, N., & Prabhakar, R. (2015). Bonebiomarkers in periodontal disease: A review article. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 9(1), ZE07–ZE10.
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/11268.5438>
- Ramseier, C. A., Eick, S., Brönnimann, C., Buser, D., Brägger, U., & Salvi, G. E. (2016).

- Host-derived biomarkers at teeth and implants in partially edentulous patients. A 10-year retrospective study. *Clinical Oral Implants Research*, 27(2), 211–217. <https://doi.org/10.1111/clr.12566>
- Rosier, B. T., Marsh, P. D., & Mira, A. (2018). Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. *Journal of Dental Research*, 97(4), 371–380. <https://doi.org/10.1177/0022034517742139>
- Saaby, M., Karring, E., Schou, S., & Isidor, F. (2016). Factors influencing severity of periimplantitis. *Clinical Oral Implants Research*, 27(1), 7–12. <https://doi.org/10.1111/clr.12505>
- Sánchez-Pérez, A., Moya-Villaescusa, M. J., & Caffesse, R. G. (2012). Presence of aspartate aminotransferase in peri-implant crevicular fluid with and without mucositis. *Journal of Oral Implantology*, 38(2), 115–123. <https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-10-00055>
- Schett, G. (2011). Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *European Journal of Clinical Investigation*, 41(12), 1361–1366. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2011.02545.x>
- Schierano, G., Pejrone, G., Brusco, P., Trombetta, A., Martinasso, G., Preti, G., & Canuto, R. A. (2008). TNF- α TGF- β 2 and IL-1 β levels in gingival and peri-implant crevicular fluid before and after de novo plaque accumulation. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(6), 532–538. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01224.x>
- Schwarz, F., Derks, J., Monje, A., & Wang, H. L. (2018). Peri-implantitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 45 Suppl 2, S246–S266. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12954>
- Sehdev, B., Ganji, K. K., Bhongade, M. L., Toriya, J., Imanishi, T., Shoumura, M., & Alam, M. K. (2017). Evaluation of the impact of the clinical periodontal status on volumetric features of gingival crevicular fluid by using periotron® 8000. *Journal of Hard Tissue Biology*, 26(2), 187–194. <https://doi.org/10.2485/jhtb.26.187>
- Severino, V. O., Beghini, M., de Araújo, M. F., de Melo, M. L. R., Miguel, C. B., Rodrigues, W. F., & de Lima Pereira, S. A. (2016). Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-33 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Archives of Oral Biology*, 72, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.08.021>
- Severino, V. O., Napimoga, M. H., & De Lima Pereira, S. A. (2011). Expression of IL-6,

- IL-10, IL-17 and IL-8 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Archives of Oral Biology*, 56(8), 823–828. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.01.006>
- Sharaf-Eldin, W. E., Abu-Shahba, N., Mahmoud, M., & El-Badri, N. (2016). The modulatory effects of mesenchymal stem cells on osteoclastogenesis. *Stem Cells International*. <https://doi.org/10.1155/2016/1908365>
- Sharma, C. G., & Pradeep, A. R. (2007). Plasma and crevicular fluid osteopontin levels in periodontal health and disease. *Journal of Periodontal Research*, 42(5), 450–455. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.00968.x>
- Singh, A., Gill, G., Kaur, H., Amhmed, M., & Jakhu, H. (2018). Role of osteopontin in bone remodeling and orthodontic tooth movement: a review. *Progress in Orthodontics*, 19(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s40510-018-0216-2>
- Smeets, R., Henningsen, A., Jung, O., Heiland, M., Hammächer, C., & Stein, J. M. (2014). Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis - a review. *Head and Face Medicine*, 10, 34. <https://doi.org/10.1186/1746-160X-10-34>
- Song, Z., Weigl, P., & Wang, B. (2019). Correlations of inflammatory cytokines, oxidative stress markers, and matrix metalloproteinases in gingival crevicular fluid with peri-implantitis. *European Journal of Inflammation*, 17. <https://doi.org/10.1177/2058739219845542>
- Sorsa, T., Gieselmann, D., Arweiler, N. B., & Hernández, M. (2017). A quantitative point-of-care test for periodontal and dental peri-implant diseases. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.69>
- Sorsa, T., Tjäderhane, L., Kontinen, Y. T., Lauhio, A., Salo, T., Lee, H. M., Golub, L. M., Brown, D. L., & Mäntylä, P. (2006). Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Annals of Medicine*, 38(5), 306–321. <https://doi.org/10.1080/07853890600800103>
- Sorsa, T., Tjäderhane, L., & Salo, T. (2004). Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Diseases*, 10(6), 311–318. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2004.01038.x>
- Strbac, G. D., Monov, G., Cei, S., Kandler, B., Watzek, G., & Gruber, R. (2006). Cathepsin K levels in the crevicular fluid of dental implants: A pilot study. *Journal of Clinical Periodontology*, 33(4), 302–308. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2006.00904.x>
- Subbarao, K. C., Nattuthurai, G. S., Sundararajan, S. K., Sujith, I., Joseph, J., & Syedshah,

- Y. P. (2019). Gingival crevicular fluid: An overview. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 11(Suppl 2), S135–S139. https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_56_19
- Taba, M., Kinney, J., Kim, A. S., & Giannobile, W. V. (2005). Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dental Clinics of North America*, 49(3), 551–571. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2005.03.009>
- Teixeira, M. K. S., Lira-Junior, R., Telles, D. M., Lourenço, E. J. V., & Figueredo, C. M. (2017). Th17-related cytokines in mucositis: is there any difference between peri-implantitis and periodontitis patients? *Clinical Oral Implants Research*, 28(7), 816–822. <https://doi.org/10.1111/clr.12886>
- Thierbach, R., Maier, K., Sorsa, T., & Mäntylä, P. (2016). Peri-implant sulcus fluid (PISF) matrix metalloproteinase (MMP)-8 levels in peri-implantitis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(5), ZC34–ZC38. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/16105.7749>
- Tümer, C., Aksoy, Y., Güncü, G. N., Nohutcu, R. M., Kilinc, K., & Tözüm, T. F. (2008). Possible impact of inflammatory status on C-telopeptide pyridinoline cross-links of Type I collagen and osteocalcin levels around oral implants with peri-implantitis: A controlled clinical trial. *Journal of Oral Rehabilitation*, 35(12), 934–939. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2008.01879.x>
- Turri, A., Rossetti, P. H., Canullo, L., Grusovin, M. G., & Dahlin, C. (2016). Prevalence of Peri-implantitis in Medically Compromised Patients and Smokers: A Systematic Review. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 31(1), 111–118. <https://doi.org/10.11607/jomi.4149>
- Wassall, R. R., & Preshaw, P. M. (2016). Clinical and technical considerations in the analysis of gingival crevicular fluid. *Periodontology 2000*, 70(1), 65–79. <https://doi.org/10.1111/prd.12109>
- Wohlfahrt, J. C., Aass, A. M., Granfeldt, F., Lyngstadaas, S. P., & Reseland, J. E. (2014). Sulcus fluid bone marker levels and the outcome of surgical treatment of peri-implantitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(4), 424–431. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12229>
- Xiao, W., Wang, Y., Pacios, S., Li, S., & Graves, D. T. (2015). Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Frontiers of Oral Biology*, 18, 9–16. <https://doi.org/10.1159/000351895>
- Yakar, N., Guncu, G. N., Akman, A. C., Pinar, A., Karabulut, E., & Nohutcu, R. M.

- (2019). Evaluation of gingival crevicular fluid and peri-implant crevicular fluid levels of sclerostin, TWEAK, RANKL and OPG. *Cytokine*, 113, 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.10.021>
- Yalçın, S., Başeğmez, C., Mijiritsky, E., Yalçın, F., Işık, G., & Onan, U. (2005). Detection of implant crevicular fluid prostaglandin E2 levels for the assessment of peri-implant health: A pilot study. *Implant Dentistry*, 14(2), 194–200. <https://doi.org/10.1097/01.id.0000165027.30821.90>
- Yamalik, N., Günday, S., Uysal, S., Kiliç, K., Karabulut, E., & Tözüm, T. F. (2012). Analysis of Cathepsin-K Activity at Tooth and Dental Implant Sites and the Potential of This Enzyme in Reflecting Alveolar Bone Loss. *Journal of Periodontology*, 83(4), 498–505. <https://doi.org/10.1902/jop.2011.110232>
- Yi, C., Hao, K. Y., Ma, T., Lin, Y., Ge, X. Y., & Zhang, Y. (2017). Inhibition of cathepsin K promotes osseointegration of titanium implants in ovariectomised rats. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep44682>
- Zani, S. R., Moss, K., Shibli, J. A., Teixeira, E. R., de Oliveira Mairink, R., Onuma, T., Feres, M., & Teles, R. P. (2016). Peri-implant crevicular fluid biomarkers as discriminants of peri-implant health and disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(10), 825–832. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12586>
- Zhang, Q., Chen, B., Yan, F., Guo, J., Zhu, X., Ma, S., & Yang, W. (2014). Interleukin-10 inhibits bone resorption: A potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/284836>
- Ziebolz, D., Schmalz, G., Gollasch, D., Eickholz, P., & Rinke, S. (2017). Microbiological and aMMP-8 findings depending on peri-implant disease in patients undergoing supportive implant therapy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(1), 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.02.008>
- Zoch, M. L., Clemens, T. L., & Riddle, R. C. (2016). New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*, 82, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.046>